

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. Gress

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

Mechanismen der NFATc1-abhängigen Regulation von Stammzeleigenschaften im Pankreaskarzinom



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sophia Vogt

aus Stuttgart

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
10.06.2016.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Volker Ellenrieder

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Volker Fendrich

<u>Zusammenfassung</u>	<u>VII</u>
<u>Summary</u>	<u>VIII</u>
<u>1 Einleitung</u>	<u>- 1 -</u>
1.1 Das Pankreaskarzinom	- 1 -
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Pankreaskarzinoms	- 1 -
1.1.2 Histologische und molekulare Merkmale des Pankreaskarzinoms	- 2 -
1.2 Der Tumorsuppressor p53	- 5 -
1.2.1 Funktion und Regulation von p53	- 5 -
1.2.2 Die Rolle von p53 im Pankreaskarzinom	- 6 -
1.3 MicroRNAs	- 9 -
1.3.1 Struktur und Funktion von microRNAs	- 9 -
1.3.2 MicroRNAs im Pankreaskarzinom	- 10 -
1.4 Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)	- 11 -
1.4.1 Struktur und Funktion von NFAT	- 11 -
1.4.2 Der Ca ²⁺ /Calcineurin/NFAT-Signalweg	- 11 -
1.4.3 Die Rolle von NFATc1 im Pankreaskarzinom	- 14 -
1.4.4 Transgene Mauslinien	- 15 -
1.5 Stammzellähnliche Tumorzellen und deren Regulatoren	- 17 -
1.5.1 Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften	- 17 -
1.5.2 Regulatoren der stammzellähnlichen Tumorzellen	- 18 -
1.5.3 Stammzellähnliche Tumorzellen und Chemoresistenz	- 20 -
<u>2 Zielsetzung der Arbeit</u>	<u>- 21 -</u>
<u>3 Material</u>	<u>- 22 -</u>
3.1 Zelllinien und verwendete Medien	- 22 -
3.1.1 Murine und humane Pankreaskarzinomzelllinien und deren Medien	- 22 -
3.1.2 Medium zur Durchführung des Sphere-Assays	- 23 -
3.1.3 Medium zur Kryokonservierung von Zellen	- 23 -
3.2 Puffer und Lösungen	- 23 -
3.2.1 Puffer zur Isolierung von Tumorzellen aus Gewebe	- 23 -

3.2.2	Puffer und Lösungen für Proteinexpressionsanalysen	- 24 -
3.2.3	Puffer für Chromatinimmunpräzipitation	- 25 -
3.2.4	Puffer für Genotypisierung transgener Mäuse	- 27 -
3.2.5	Puffer für Immunhistochemie	- 27 -
3.3	Chemikalien und Biochemikalien	- 28 -
3.4	Kits	- 31 -
3.5	Antikörper	- 32 -
3.5.1	Antikörper für Immunhistochemie	- 32 -
3.5.2	Antikörper für Western Blot	- 32 -
3.5.3	Antikörper für Chromatinimmunpräzipitation	- 32 -
3.6	Primer	- 33 -
3.6.1	Primer für qPCR	- 33 -
3.6.2	Primer für Chromatinimmunpräzipitation	- 34 -
3.6.3	Primer zur Genotypisierung transgener Mäuse	- 35 -
3.6.4	miRNA-Primer	- 35 -
3.7	Konstrukte	- 36 -
3.7.1	siRNA-Konstrukte	- 36 -
3.7.2	Mimics	- 36 -
3.7.3	Antagomir	- 36 -
3.8	Labormaterialien	- 36 -
3.9	Laborgeräte	- 38 -
3.10	Software	- 39 -
<u>4</u>	<u>Methoden</u>	<u>- 40 -</u>
4.1	Generieren und Charakterisieren der transgenen KNP^{+/-}C-Maus	- 40 -
4.1.1	Tierhaltung	- 40 -
4.1.2	Tierversuchsgenehmigung	- 40 -
4.1.3	Versuchstiere	- 40 -
4.1.4	Zucht und Kreuzung des transgenen Mausmodells KNP ^{+/-} C	- 41 -
4.1.5	Gewinnen und Aufbereiten von Pankreastumorgewebe	- 43 -
4.2	Histologische Methoden	- 43 -
4.2.1	Fixieren von Pankreastumorgewebe auf Objektträgern	- 43 -
4.2.2	HE-Färbung	- 44 -

4.2.3 Immunhistochemische Färbung	- 44 -
4.3 Zellbiologische Methoden	- 45 -
4.3.1 Zellkultur	- 45 -
4.3.2 Behandeln von Zellen	- 47 -
4.3.3 Transfektion von Zellen	- 47 -
4.3.4 Sphere-Assay	- 48 -
4.3.5 BrdU-Assay	- 49 -
4.4 Molekularbiologische Methoden	- 51 -
4.4.1 Genotypisierung transgener Mäuse	- 51 -
4.4.2 Proteinexpressionsanalysen	- 54 -
4.4.3 mRNA-Expressionsanalysen	- 57 -
4.4.4 MicroRNA-Expressionsanalysen	- 60 -
4.4.5 Chromatinimmunpräzipitation	- 62 -
4.5 Statistische Auswertung und graphische Darstellung	- 65 -
<u>5 Ergebnisse</u>	<u>- 66 -</u>
5.1 Charakterisierung des Mausmodells KNP ^{+/-} C	- 66 -
5.2 Der Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 führt zu einer gesteigerten Expression von Stammzellfaktoren	- 69 -
5.3 MicroRNAs vermitteln die Reprimierung von Stammzellfaktoren durch den Tumorsuppressor p53	- 76 -
5.4 Die Inhibition von NFATc1 resultiert in einer verminderten Expression von Stammzellregulatoren	- 83 -
5.5 NFATc1 bindet an den Enhancer von Sox2	- 91 -
5.6 NFATc1 ist treibende Kraft der Sphere-Formation durch gesteigerte Expression von Stammzellregulatoren	- 93 -
5.7 Die Inhibierung von NFATc1 durch CsA führt zu verminderter Chemoresistenz von Tumorzellen	- 100 -
<u>6 Diskussion</u>	<u>- 103 -</u>
6.1 Der Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 ist mit einem entdifferenzierten Phänotyp des Pankreaskarzinoms assoziiert	- 103 -

6.2 Der Tumorsuppressor p53 reprimiert Stammzellfaktoren durch microRNAs	- 107 -
6.3 NFATc1 fördert Entdifferenzierung durch Expression von Stammzellfaktoren	- 109 -
6.4 Stammzellähnliche Tumorzellen im Pankreaskarzinom und deren Regulation durch NFATc1 und Sox2	- 112 -
6.5 Therapeutische Konsequenzen	- 115 -
6.6 Schlussfolgerung	- 117 -
<u>7 Literaturverzeichnis</u>	<u>- 119 -</u>
<u>8 Anhang</u>	<u>- 129 -</u>
8.1 Abbildungsverzeichnis	- 129 -
8.2 Tabellenverzeichnis	- 132 -
8.3 Abkürzungsverzeichnis	- 133 -
8.4 Schreibweisen	- 137 -
8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer	- 138 -
8.6 Danksagung	- 139 -

Zusammenfassung

Die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms ist vor allem dem aggressiven Wachstumsverhalten und der ausgeprägten Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika geschuldet. Beide Charakteristika sind mit einer Entdifferenzierung des Tumors und der Aneignung von Stammzeleigenschaften assoziiert. Die Transformation in stammzellartige Tumorzellen geht mit der Aktivierung spezifischer Gensignaturen und der Induktion von Stammzellfaktoren (Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1) einher. Ein zentrales Ereignis der Entdifferenzierung und Aneignung von Stammzeleigenschaften ist der Verlust des Tumorsuppressors p53, der in 75 % aller humanen Pankreaskarzinome beobachtet wird. Das trifft in besonderem Maße auf Tumore mit Aktivierung des onkogenen Transkriptionsfaktors NFATc1 zu, der ebenfalls in der Mehrzahl humaner Pankreaskarzinome exprimiert wird und das Wachstum und Metastasierungsverhalten von Tumoren moduliert. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Regulation von Stammzeleigenschaften im Pankreaskarzinom durch einen bislang nicht beschriebenen und antagonistisch wirkenden p53-NFATc1-Signalweg. Wir konnten zeigen, dass die Funktion von NFATc1 im Pankreaskarzinom durch p53 definiert wird und dass der Verlust von p53 über NFATc1-abhängige Aktivierung des Stammzellfaktors Sox2 (und anderer Stammzellfaktoren) sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Ausbildung von Stammzeleigenschaften begünstigt. Dabei induziert NFATc1 die Expression von Sox2 durch direkte Bindung an Promotor und Enhancer sowie gleichzeitige Rekrutierung der RNA-Polymerase II. Die NFATc1-Sox2-vermittelte Aneignung von Stammzeleigenschaften setzt eine Hemmung des hierarchisch dominanten p53-microRNA-200c-Signalweges voraus, der die Aktivierung von Sox2 und anderer Stammzellfaktoren unterdrückt. Zusammenfassend tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorprogression im Pankreaskarzinom bei und zeigen, dass zentrale Aspekte der zellulären Plastizität und Regulation von Stammzeleigenschaften durch ein hierarchisch angelegtes Netzwerk kontrolliert werden. Die Erkenntnis, dass der häufige Verlust von p53 durch Aktivierung des NFATc1-Sox2-Signalweges zur Ausbildung von Stammzeleigenschaften führt, eröffnet möglicherweise neue und zielgerichtete Ansätze in der Behandlung des Pankreaskarzinoms.

Summary

Important causes for the poor prognosis of pancreatic cancer are in particular its aggressive growth pattern and its distinct resistance against chemotherapy. Both features are associated with a dedifferentiated phenotype and the acquisition of stem cell features. The transformation into stem cell-like cancer cells is accompanied by the activation of specific gene signatures as well as by the induction of certain stem cell factors (Sox2, Klf4, Oct4, Nanog and Bmi1). The loss of the tumour suppressor p53 is considered as a key event in dedifferentiation and acquisition of stem cell features and is observed in 75 % of all human pancreatic cancers. This specifically applies to tumours with activation of the oncogenic transcription factor NFATc1, which is also expressed in the majority of human pancreatic cancers and contributes to dissemination and metastatic spread. The main focus of this work was the regulation of stem cell features in pancreatic cancer by a not yet described, antagonistic p53-NFATc1 signaling pathway. It could be shown that the function of NFATc1 in pancreatic cancer is defined by p53. The loss of p53 leads to acquisition of stem cell features by NFATc1-dependent activation of Sox2 and other stem cell factors. NFATc1 induces Sox2 expression by direct promotor and enhancer binding and simultaneous recruitment of RNA polymerase II. To allow NFATc1-Sox2-dependent acquisition of stem cell features, inhibition of the dominating p53-microRNA-200c signaling pathway, which inhibits activation of Sox2 and other stem cell factors, is required.

In conclusion, the results of this work contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of tumour progression of pancreatic cancer and show that central elements of cell plasticity and regulation of stem cell features are regulated by a hierarchically structured network. The knowledge that the frequently observed loss of p53 leads to acquisition of stem cell features on the basis of activation of NFATc1-Sox2 signaling pathway might reveal new promising targets for future therapy of pancreatic cancer.

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Pankreaskarzinoms

Das Adenokarzinom des Pankreas zählt zu den soliden Tumoren des Menschen mit der schlechtesten Prognose (Wolfgang *et al.* 2013). In Europa beträgt die Inzidenz bei Männern 11,6 und bei Frauen 8,1 pro 100.000 Einwohner (Malvezzi *et al.* 2013). Im Jahr 2013 starben in Deutschland rund 16600 Menschen an den Folgen des Pankreaskarzinoms. Bösartige Neubildungen des Pankreas belegen damit in Deutschland Platz 4 der Krebstodesfälle in der Todesursachenstatistik und Platz 13 aller Todesursachen nach ICD10 (Todesursachenstatistik 2013). Das Pankreaskarzinom hat mit nur 4 % eine sehr geringe 5-Jahres-Überlebensrate (Vincent *et al.* 2011). Seine ausgesprochen schlechte Prognose liegt darin begründet, dass das Pankreaskarzinom aufgrund seiner anatomischen Lage und fehlender spezifischer Marker in der Regel erst spät diagnostiziert wird und zugleich früh metastasiert (Spalding und Williamson 2007). Dies führt dazu, dass das Pankreaskarzinom in mehr als 80 % der Fälle in einem nicht mehr kurativen Stadium diagnostiziert wird (Partensky 2013). Zudem ist es durch eine ausgeprägte Chemoresistenz charakterisiert, weshalb die chirurgische Resektion die einzige kurative Option darstellt. Durch chirurgische Resektion und adjuvante Therapie mit den Pyrimidinanaloga Gemcitabine oder 5-Floururacil kann die mediane Überlebenszeit von 3 – 6 Monate ohne Behandlung auf 23 Monate verlängert werden (Spalding und Williamson 2007). Als palliative Chemotherapie war bis vor kurzem die Monotherapie mit Gemcitabine Mittel der ersten Wahl. Neuere Studien zeigen allerdings einen positiven Effekt der Kombinationstherapie aus 5-Floururacil, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) auf die Überlebensdauer. Diese Kombination weist jedoch ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil auf und sollte nur bei Patienten unter 75 Jahren mit gutem Performance Status (0 oder 1) angewendet werden (Seufferlein *et al.* 2012).

Das Pankreaskarzinom ist neben dem Bronchialkarzinom bei der Frau und dem Weichteilsarkom einer der wenigen Tumore, deren Mortalität in den vergangenen Jahren in Europa zugenommen hat. Die Abnahme der Mortalitäten anderer Krebsarten lässt sich durch eine Verbesserung der Diagnostik und Früherkennung

sowie durch einen Fortschritt in der Therapie erklären (Bosetti *et al.* 2013). Das Fehlen dieser mortalitätssenkenden Faktoren erklärt jedoch nicht die Zunahme der Mortalität des Pankreaskarzinoms. Nikotinabusus, welcher als wichtiger Risikofaktor für das Pankreaskarzinom gilt und wohl für 20 % aller Fälle verantwortlich ist (Vincent *et al.* 2011), hat in den letzten Jahren abgenommen, was einen positiven Einfluss auf die Mortalitätsrate des Pankreaskarzinoms haben sollte. Die Prävalenz der Risikofaktoren Fettleibigkeit und Diabetes mellitus, nimmt in Europa hingegen stetig zu (Bosetti *et al.* 2013). Weitere Risikofaktoren sind starker Alkoholkonsum, eine positive Familienanamnese und ein hohes Lebensalter – das Pankreaskarzinom tritt vor allem im Alter von 60 – 80 Jahren auf (Vincent *et al.* 2011; Spalding und Williamson 2007). Patienten mit chronischer Pankreatitis haben im Vergleich zur restlichen Bevölkerung ein 4 – 18fach höheres Risiko am Pankreaskarzinom zu erkranken (Spalding und Williamson 2007).

Der Differenzierungsgrad des Tumors hat einen großen Einfluss auf die Prognose des Patienten. So sind schlecht differenzierte Tumore mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert. Aufgrund verschiedener Studien gibt es die Empfehlung, das Grading in das postoperative Staging aufzunehmen (Wasif *et al.* 2010; Rochefort *et al.* 2013). Tab. 1 gibt eine Übersicht über das Grading des dukalen Adenokarzinoms des Pankreas (Damjanov und Fan 2007).

Tab. 1: Grading des dukalen Adenokarzinoms des Pankreas (Damjanov und Fan 2007)

Grading	Differenzierung	Drüsenanteil
G1	Gut differenziert	>95 %
G2	Mäßig differenziert	50 – 95 %
G3	Schlecht differenziert	5 – 50 %
	Undifferenziert/anaplastisch	<5 %

1.1.2 Histologische und molekulare Merkmale des Pankreaskarzinoms

Das dukale Adenokarzinom des Pankreas ist mit mehr als 90 % der häufigste Tumor des exokrinen Pankreas (Spalding und Williamson 2007). Die Entstehung des Pankreaskarzinoms verläuft über mehrere Vorläuferstadien. Man unterscheidet drei verschiedene Vorläuferstadien, für die seit 2004 klare Richtlinien zur Klassifizierung bestehen (Hruban *et al.* 2004). Unterschieden

werden die Vorläuferstadien *pancreatic intraepithelial neoplasia* (PanIN), *mucinous cystic neoplasm* (MCN) und *intraductal papillary mucinous neoplasm* (IPMN), von welchen die PanINs bei weitem die häufigsten sind. Die weniger als 0,5 cm messenden PanIN-Läsionen entstehen aus den kleinen Pankreasgängen und werden morphologisch in drei Grade (PanIN-1 – PanIN-3) mit zunehmender histologischer Veränderung des Epithels unterteilt. Dabei sind die flachen (1A) oder papillären (1B) PanIN-1-Läsionen durch Abwesenheit von nukleären Atypien charakterisiert. Im Gegensatz zu PanIN-2-Läsionen, welche bereits nukleäre Atypien sowie eine mikropapilläre Architektur aufweisen. PanIN-3-Läsionen – auch bekannt als *Carcinoma in situ* – sind gekennzeichnet durch nukleäre Atypien, Polaritätsverlust sowie eine erhöhte Mitoserate (Hruban et al. 2008; Koorstra et al. 2008). In Abb. 1 sind histologische Bilder der einzelnen PanIN-Läsionen dargestellt (Ottenhof et al. 2011). Es ist bisher noch nicht genau geklärt mit welcher Häufigkeit und Geschwindigkeit PanIN-Läsionen zum invasiven Pankreaskarzinom fortschreiten (Hruban et al. 2008). Diverse Studien weisen allerdings darauf hin, dass PanIN-Läsionen mit relativ großer Häufigkeit auch in gesunden Patienten vorkommen (Hruban et al. 2007; Koorstra et al. 2009). Andea und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 2003 die Gewebe von 82 Pankreaskarzinomen und 152 nicht malignen Pankreata auf PanIN-Läsionen. 82 % der Pankreaskarzinome, 60 % der Pankreata mit Pankreatitis und 16 % der gesunden Pankreata trugen PanIN-Läsionen. Dabei wurden PanIN-3-Läsionen nur in Geweben mit Pankreatitis (4 %) und im Pankreaskarzinom (40 %) beobachtet (Andea et al. 2003). Wenn man die relativ große Häufigkeit von PanIN-Läsionen bei gesunden Patienten (16 %) im Kontext mit der verhältnismäßig geringen Inzidenz für das Pankreaskarzinom von 10 pro 100.000 Einwohner (Malvezzi et al. 2013) sieht, muss man davon ausgehen, dass nur ein sehr geringer Anteil der PanIN-Läsionen zum invasiven Karzinom fortschreitet (Koorstra et al. 2009). Gesichert ist, dass mit Fortschreiten der Vorläuferläsionen bis zum invasiven duktalem Pankreaskarzinom auch eine Zunahme von Mutationen sowie epigenetischer Veränderungen von Tumorsuppressorgen und Protoonkogenen auftritt (Hruban et al. 2008). Zwar kann keine eindeutige Reihenfolge der Mutationen festgestellt werden, jedoch ereignen sich manche spezifische Mutationen regelhaft vor anderen genetischen Defekten. So gehören die Mutation im *KRAS*-Gen und die Verkürzung der Telomere eher zu frühen Ereignissen in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms, während

1 Einleitung

Mutationen im *INK4A*-, *TP53*- und *SMAD4*-Gen erst in fortgeschrittenen PanIN-Läsionen bzw. im invasiven Pankreaskarzinom beobachtet werden (Hruban *et al.* 2008). Tab. 2 gibt einen Überblick über die am häufigsten mutierten Gene im humanen Pankreaskarzinom und Abb. 1 ordnet die am häufigsten mutierten Gene in das Karzinogenesemodell ein.

Tab. 2: Die häufigsten Mutationen im humanen Pankreaskarzinom (Hingorani *et al.* 2005; Ottenhof *et al.* 2011)

Mutiertes Gen	Funktion	Häufigkeit
<i>CDKN2/p16</i>	G1-/S-Phase Zellzyklusarrest	95 %
<i>KRAS2</i>	ERK-MAP-Kinase Signalweg	>90 %
<i>TP53</i>	Zellzyklusarrest & Apoptose	75 %
<i>Cyclin D</i>	Zellzyklusprogression	65 %
<i>SMAD4</i>	TGFβ	55 %
<i>BRCA2</i>	Reparatur von DNA-Schäden	<10 %*

* <10 % im sporadischen Pankreaskarzinom, aber 19 % im familiären Pankreaskarzinom

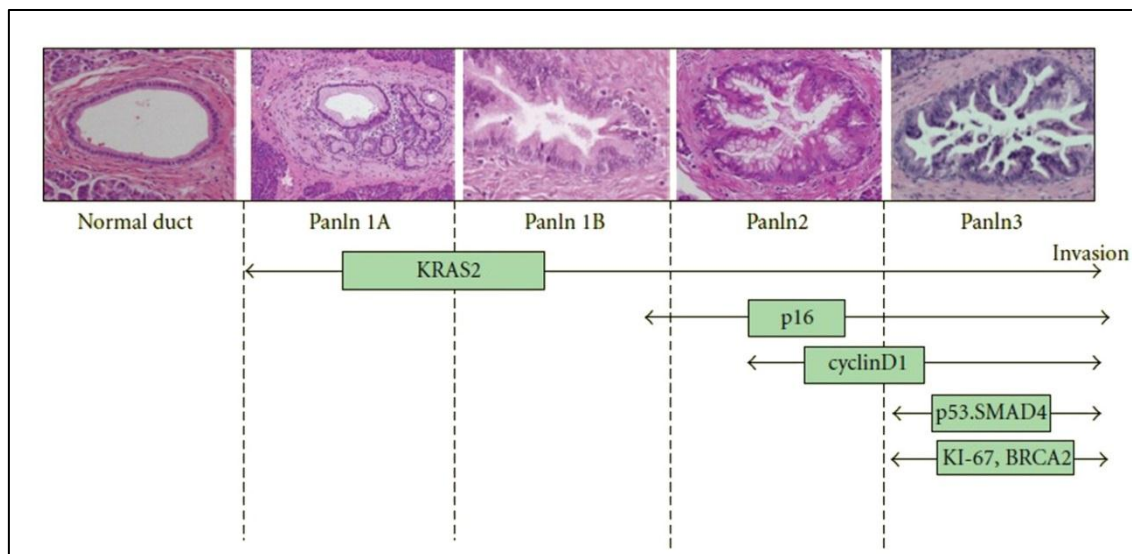


Abb. 1: Karzinogenese des Pankreaskarzinoms vom normalen Epithel bis zu PanIN-3-Läsionen (Ottenhof *et al.* 2011). Die Tumorprogression ist mit einer stufenweisen Akkumulation charakteristischer Mutationen vergesellschaftet.

KRAS gilt mit einer Mutationsrate von mehr als 90 % als das am häufigsten mutierte Protoonkogen im Pankreaskarzinom (Ottenhof *et al.* 2011). Das zur Familie der *RAS*-Gene gehörige *KRAS* codiert für ein membrangebundenes Ras-Protein, welches nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren wie EGF und anschließende Bindung von GTP in den aktiven Zustand versetzt wird. Durch eine *gain-of-function*-Mutation, in der Regel im Codon 12 des *KRAS*-Gens, wird die

intrinsische GTPase-Aktivität des Proteins beeinträchtigt, die das Protein normalerweise durch Abbau von GTP zurück in den inaktiven Zustand versetzt. So bleibt das Ras-Protein im aktiven Zustand und aktiviert die *downstream* Raf-MAP2K-MAPK-PI3K-Akt-Kaskade, was das Zellüberleben, die Zellzyklusprogression, sowie die Zellmotilität fördert (Wong und Lemoine 2009; Schneider und Schmid 2003).

1.2 Der Tumorsuppressor p53

1.2.1 Funktion und Regulation von p53

Der Transkriptionsfaktor p53 fungiert als Regulator von Genen, die in Signalkaskaden von Apoptose, Seneszenz und Zellzyklusarrest involviert sind (Spike und Wahl 2011). Hierbei reagiert der Transkriptionsfaktor p53 auf Stresssignale wie DNA-Schäden, Hypoxie, Mangel an Ribonukleotidtriphosphaten, Schäden des mitotischen Spindelapparates, Hemmung der Ribosomenbiosynthese, Nahrungskarenz sowie auf die Aktivierung bestimmter Onkogene (Feng *et al.* 2011). Wegen seiner unentbehrlichen Rolle als Koordinator der Zellantwort auf genotoxischen Stress wird der Tumorsuppressor auch als “Wächter des Genoms” bezeichnet (Lane 1992). p53 ist in ein komplexes Netzwerk sowohl positiver als auch negativer Feedbackloops integriert, welche ihre Wirkung auf p53 größtenteils über die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 sowie über MDMx und andere Ubiquitin-Ligasen vermitteln (Wade *et al.* 2010; Harris und Levine 2005; Brooks und Gu 2006). In Zellen, die keinem Stress ausgesetzt sind, führt MDM2 mittels Ubiquitinierung zu einer Degradierung von p53 und hält die Konzentration des Tumorsuppressors so auf einem niedrigen Niveau (Harris und Levine 2005; Brooks und Gu 2006). Durch Bindung an oder Phosphorylierung von MDM2 durch seine Regulatoren kann dessen Aktivität und somit die Konzentration von p53 moduliert werden. Weitere Modifikationen von p53 wie die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung oder Sumoylierung können zu einer Aktivitätssteigerung von p53 führen: zum einen durch eine Verlängerung der Halbwertszeit von wenigen Minuten auf Stunden, zum anderen durch die gesteigerte Bindungsaffinität von p53 an seine Zielgene (Harris und Levine 2005; Feng *et al.* 2011).

Als Transkriptionsfaktor reguliert aktives p53 seine Zielgene durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten *Responsive Elements* (REs) (el-Deiry *et al.* 1992; Feng *et al.* 2011). So bindet p53 je nach Art des Stresses, dem die Zelle ausgesetzt ist, z.B. an das RE von p21 oder Retinoblastom (Rb), was zum Zellzyklusarrest führt, oder es steigert die Expression von Apoptosemediatoren wie puma oder bax, indem es an die REs derer Gene bindet und führt so zum programmierten Zelltod (Spike und Wahl 2011; Koorstra *et al.* 2008). Der Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 hat also Einfluss auf die zwei wichtigsten Mechanismen einer gestörten Zellzahlregulation: die vermehrte Zellteilung durch den Wegfall des Zellzyklusarrests und der reduzierte Zelltod durch verminderte p53-vermittelte Apoptose (Koorstra *et al.* 2008).

1.2.2 Die Rolle von p53 im Pankreaskarzinom

Im Vergleich zu anderen humanen Tumoren, in denen p53 in bis zu 50 % der Fälle mutiert ist, liegt die Mutationsrate im Pankreaskarzinom mit 75 % überdurchschnittlich hoch (Olivier *et al.* 2010; Hingorani *et al.* 2005). In der Datenbank IARC TP53, die sämtliche *TP53*-Genvarianten in humanen Karzinomen zusammenfasst, wurden die Mutationen von *TP53* in 285 Pankreaskarzinomen genau analysiert. In fast 70 % der Fälle handelt es sich um *missense*-Mutationen, die zum Austausch einer einzelnen Aminosäure im p53 Protein und somit zu einer veränderten Funktion des Proteins führen (Abb. 2). Wenn man die Positionen der Mutationen im codierenden Abschnitt des *TP53*-Genes betrachtet, dann fällt auf, dass der Großteil der Mutationen zwischen Codon 102 und 292 liegt, also dem Abschnitt, der für die DNA-Bindungsdomäne von p53 kodiert (Abb. 3) (Olivier *et al.* 2010; IARC November 2012).

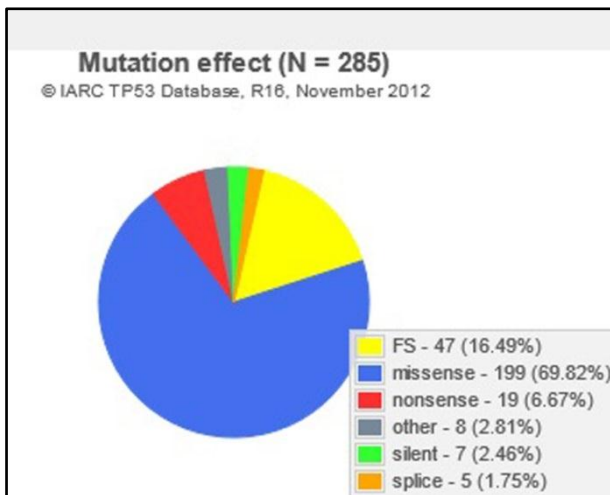


Abb. 2: Anteil der Mutationsformen aller *TP53*-Mutationen in 285 Pankreaskarzinomgeweben (IARC November 2012).

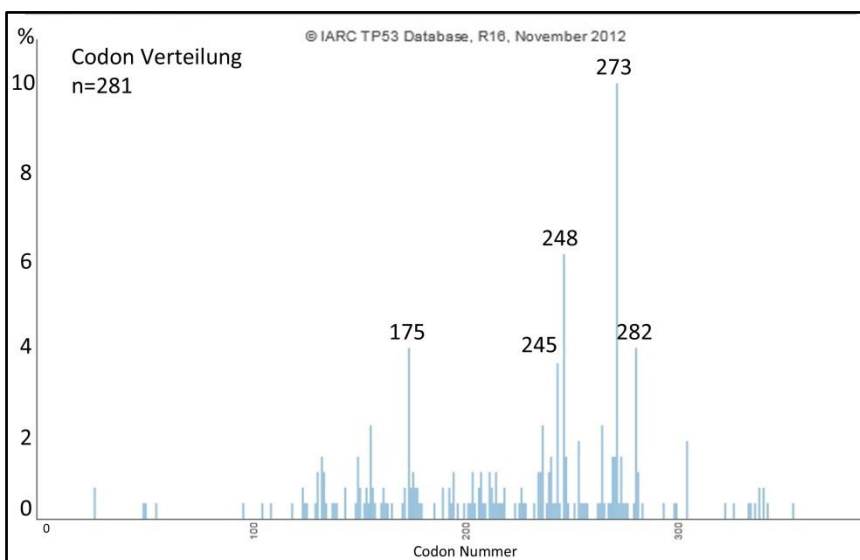


Abb. 3: Prozentuale Häufigkeit der *TP53*-Mutationen in 281 Pankreaskarzinomgeweben in Abhängigkeit von der Codon-Position (IARC November 2012).

Die fünf im Pankreaskarzinom am häufigsten mutierten Codons sind auch in anderen Krebsarten bekannte *hotspots*, also Codons, an denen besonders häufig Mutationen auftreten: Arg175, Gly245, Arg248, Arg273, Arg282. Die beiden im humanen Pankreaskarzinom am häufigsten mutierten Aminosäuren Arg248 und Arg273 interagieren direkt mit der DNA, während Arg175, Gly245 und Arg282 als Stabilisatoren der DNA-Bindungsdomäne fungieren (Cho *et al.* 1994; Tu *et al.* 2008). Punktmutationen in diesen Codons führen durch Austausch der Aminosäuren zu einer veränderten DNA-Bindungsaffinität und hierdurch zu einer veränderten Expression der Zielgene von p53 (Olivier *et al.* 2010; Kato *et al.* 2003). Doch nicht nur durch veränderte Bindungsaffinität an Zielgene von Wildtyp-p53

scheinen Mutationen von p53 eine Rolle in der Tumorphathogenese zu spielen. Verschiedene Autoren sprechen p53-Mutanten onkogene Effekte und damit *gain-of-function*, also einen Funktionsgewinn, zu. Mutiertes p53 bindet beispielsweise an die Promotoren von c-Myc oder des Hitzeschockproteins 70, außerdem führt die Interaktion von mutiertem p53 mit dem Ras-Protein zur Transformation von embryonalen Fibroblasten der Ratte (Frazier *et al.* 1998; Tsutsumi-Ishii *et al.* 1995; Hinds *et al.* 1990).

Wie auch bei anderen Tumorsuppressoren ist bei p53 ein dominant-negativer Effekt zu beobachten: Das Produkt des mutierten Allels stört die Funktion des Wildtyp-Allels. Somit führt die Mutation in einem Allel zum gesamten Funktionsverlust des p53 Proteins (Koorstra *et al.* 2008). Begründet wird dies durch die Heterooligomerisierung von mutiertem und Wildtyp-p53. Um seine Funktion als Tumorsuppressor ausüben zu können, muss p53 als Tetramer vorliegen. Da auch mutiertes p53 die Fähigkeit zur Tetramerisierung besitzt, kann dieses zusammen mit Wildtyp-p53 ein Tetramer bilden und hierdurch die DNA-Bindungsaffinität von eigentlich intaktem p53 beeinträchtigen (Olivier *et al.* 2010; Chene 1998).

Hotspot-Mutationen von p53 führen zur Akkumulation des Proteins im Zellkern, da dieses seine Transaktivierungsfunktion gegenüber MDM2 nicht mehr ausüben kann, woraufhin der negative Feedbackloop verhindert und dadurch die Stabilität von p53 erhöht wird (Bullock und Fersht 2001; Costa *et al.* 1995). Dies macht die nukleäre Akkumulation zu einem zuverlässigen Surrogatparameter für die häufigsten inaktivierenden Mutationen von p53, was mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden kann (Baas *et al.* 1994; Costa *et al.* 1995). In einer Studie von Koorstra und Kollegen wurde im Jahr 2009 mittels Immunhistochemie die nukleäre Akkumulation von p53 in Geweben von 81 Pankreaskarzinomen sowie in einer Reihe von 58 PanIN-Läsionen analysiert. Hierbei wurde in normalem Gangepithel und in PanIN-1-Läsionen keine bis minimale nukleäre p53 Akkumulation (Histologischer Score: 0-1,86) nachgewiesen. In PanIN-3-Läsionen und im invasiven Karzinom wurde hingegen eine starke nukleäre Akkumulation von p53 (Histologischer Score: 4 bzw. 4,22) nachgewiesen. Sie postulieren daher für p53 eine wichtige Rolle in der Progression von nicht-invasiven PanIN-Läsionen zum invasiven Pankreaskarzinom (Koorstra *et al.* 2009).

Doch nicht nur an dieser kritischen Stelle in der Tumorprogression wird dem Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 eine wichtige Rolle zugesprochen. In den letzten Jahren wird der Verlust von p53 häufiger mit einem entdifferenzierten und stammzellähnlichen Phänotyp des Tumors assoziiert (Spike und Wahl 2011). Die Mechanismen, durch die der Verlust von p53 zu einem stammzellähnlichen Phänotyp führt, sind noch nicht genau geklärt. Pinho und Kollegen konnten im Jahr 2011 zeigen, dass Pankreasepithelzellen mit p53^{-/-} unter Stress eine verstärkte Fähigkeit zur Bildung von Spheres sowie eine erhöhte Expression der Stammzellfaktoren Klf4 und Bmi1 aufweisen (Pinho *et al.* 2011). Es wird vermutet, dass viele der Effekte von p53 auf Stammzeleigenschaften von Tumorzellen durch microRNAs vermittelt werden (Spike und Wahl 2011; Chang *et al.* 2011).

1.3 MicroRNAs

1.3.1 Struktur und Funktion von microRNAs

Neben der direkten Bindung an die REs seiner Zielgene gibt es für p53 eine weitere Möglichkeit, seine Zielgene zu kontrollieren: Die Regulation von spezifischen microRNAs (miRNAs), welche in den letzten Jahren zunehmend als Vermittler der Wirkung von p53 entdeckt wurden. So kann p53 die Expression seiner Zielgene regulieren ohne direkt mit deren DNA zu interagieren (Feng *et al.* 2011). MicroRNAs wurden das erste Mal in *C. elegans* im Jahr 1993 beschrieben (Lee *et al.* 1993). Es handelt sich um kleine, nicht-codierende regulatorische RNA-Moleküle, die endogen exprimiert werden. Sie binden sequenzspezifisch an die untranslatierten 3'-Enden von codierenden mRNAs wodurch sie diese destabilisieren und deren Translation verhindern (Feng *et al.* 2011; Pillai *et al.* 2007). Der Prozess der Reifung der miRNA, ausgehend von der Transkription einer *primary* (pri)-miRNA über die *precursor* (pre)-miRNA, deren Transport aus dem Nukleus ins Zytosol durch das Transportprotein Exportin 5 und schließlich die Entstehung der reifen miRNA ist ein komplexer Prozess, an dem verschiedene RNA-Polymerasen sowie Endonukleasen beteiligt sind (Lee *et al.* 2006; Seitz und Zamore 2006; Feng *et al.* 2011). Vor allem die als *seed* bezeichnete Bindungsstelle am 5'-Ende der miRNA bindet an das 3'-untranslatierte Ende der Ziel-mRNA (Bartel 2009; Griffiths-Jones *et al.* 2006; Feng *et al.* 2011). Die beiden

Hauptstrategien der miRNA zur Regulation der mRNA-Expression ihrer Zielgene sind zum einen Hemmung der Translation und zum anderen die Degradierung der mRNA durch Deadenylase-vermittelte Entfernung des Poly-A-Schwanzes (Feng *et al.* 2011; Filipowicz *et al.* 2008).

1.3.2 MicroRNAs im Pankreaskarzinom

In miRNA-Expressionsanalysen wird eine stark verminderte Expression von miRNAs in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe beobachtet. Zudem zeigen schlecht differenzierte Tumore niedrigere miRNA-Konzentrationen (Lu *et al.* 2005). Die Expressionsanalyse im Pankreaskarzinom von Lee und Kollegen im Jahr 2007 zeigte signifikante Unterschiede in den miRNA-Expressionsprofilen von Pankreaskarzinom und normalem Pankreasgewebe (Lee *et al.* 2007). Eine miRNA, die in dieser Expressionsanalyse nicht untersucht wurde, die aber von verschiedenen unabhängigen Quellen als Zielstruktur von p53 unter anderem im Pankreas beschrieben wurde, ist miR-34a (Chang *et al.* 2007; He *et al.* 2007; Tazawa *et al.* 2007; Rokavec *et al.* 2014). p53 bindet direkt an den Promotor von miR-34a, welche ihrerseits die klassischen p53-vermittelten Effekte Zellzyklusarrest und Apoptose fördert. Zudem hemmt miR-34a CD44/CD133-positive stammzellähnliche Tumorzellen des Pankreaskarzinoms (Ji *et al.* 2009). Die verminderte Expression von miR-34a im Pankreaskarzinom ist nur teilweise durch ihre Regulation durch p53 zu erklären. Eine weitere Erklärung ist die p53-unabhängige epigenetische Modulation von miR-34a im Pankreaskarzinom, welche von Nalls und Kollegen im Jahr 2011 beschrieben wurde (Nalls *et al.* 2011). Eine weitere miRNA, die eine Rolle im Pankreaskarzinom spielt, ist miR-200c (Yu *et al.* 2010). Im Mammakarzinom ist p53 an der Regulation von miR-200c beteiligt. MiR-200c vermittelt im Pankreaskarzinom die Unterdrückung von EMT (epithelial-mesenchymale Transition) und Stammzeleigenschaften (Wellner *et al.* 2009). Ob p53 beide miRNAs auch im Pankreas reguliert und die Zunahme von Stammzeleigenschaften im Pankreaskarzinom durch den Verlust von p53 und folglich eine Abnahme dieser miRNAs zu erklären ist, ist bisher nicht geklärt.

1.4 Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)

1.4.1 Struktur und Funktion von NFAT

Der *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFAT) wurde erstmals im Jahr 1988 beschrieben. Shaw und Kollegen identifizierten NFAT als einen transkriptionellen Induktor von Interleukin-2 in aktivierten T-Zellen (Shaw *et al.* 1988). Zur NFAT-Familie gehören fünf Transkriptionsfaktoren: NFATc1 (NFATc/NFAT2), NFATc2 (NFATp/ NFAT1), NFATc3 (NFATx/NFAT4), NFATc4 (NFAT3) sowie das weiter entfernt verwandte NFAT5 (TonEBP: *tonicity element-binding protein*). Die NFAT-Proteine c1 - c4 weisen den folgenden strukturellen Aufbau auf, welcher in Abb. 4 dargestellt ist. Am N-terminalen Ende befindet sich eine regulatorische Domäne, die NFAT-homologe Region (NHR). C-terminal hiervon liegt die DNA-Bindungsdomäne, welche innerhalb der NFAT-Familie hochkonserviert ist und Ähnlichkeiten mit denen der REL/NF- κ B-Familie aufweist und daher auch die Bezeichnung RHR (Rel-homologe Region) trägt. Am C-terminalen Ende liegt die carboxy-terminale Domäne, die je nach Isoform und Spleißvariante unterschiedlich lang ist (Mancini und Toker 2009). In ruhenden Zellen ist die 300 Aminosäuren umfassende NHR stark phosphoryliert, wobei Serin-reiche (SRR1-3) und Serin-Prolin-reiche (SP1-3) Regionen unterschieden werden (Beals *et al.* 1997). Zudem enthält die NFAT homologe Region die Transaktivierungsdomäne (TAD), die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) sowie zwei Calcineurin-Bindungsstellen (Hogan *et al.* 2003).

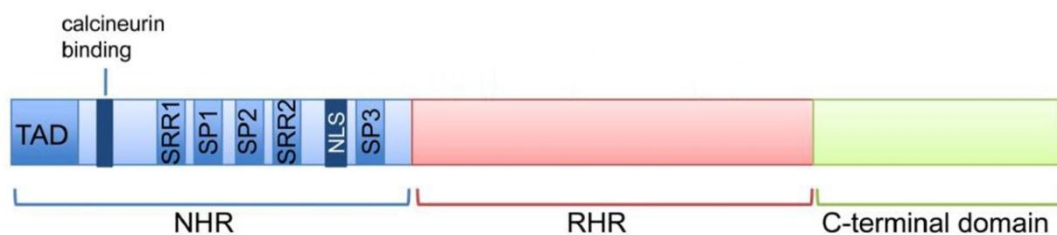


Abb. 4: Primärstruktur von NFAT (Modifiziert nach Mancini und Toker 2009). NHR: NFAT-homologe Region, RHR: Rel-homologe Region, TAD: Transaktivierungsdomäne, SRR: Serin-reiche Region, SP: Serin-Prolin-reiche Region, NLS: Nukleäre Lokalisationssequenz

1.4.2 Der Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-Signalweg

Die Transkriptionsfaktoren NFATc1 - c4 werden durch den Ca^{2+} /Calcineurin-Signalweg reguliert (Loh *et al.* 1996). Durch die Serin/Threonin-Phosphatase

Calcineurin kann das in Ruhe phosphorylierte NFAT dephosphoryliert werden und hierdurch vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren, wo es als Transkriptionsfaktor aktiv ist (Luo *et al.* 1996). Die Aktivierung von Calcineurin ist Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig. Der Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle wird durch die folgenden Mechanismen getriggert: Zum einen wird durch Bindung von Liganden an verschiedene Rezeptoren der Zelle Phospholipase C aktiviert, was zur Freisetzung von Inositol-1,4,5-triphosphat und hierdurch zum Einstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in die Zelle führt. Dadurch werden *Ca²⁺ release activated channels* (CRAC-Kanäle) geöffnet, was einen suffizienten Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zelle gewährleistet (Koenig *et al.* 2010a). Durch Bindung von Ca^{2+} an die regulatorische Untereinheit B von Calcineurin wird eine Calmodulin-Bindungsstelle an der katalytischen Untereinheit A freigelegt. Durch Bindung von Calmodulin wird eine autoinhibitorische Sequenz aus der katalytischen Tasche von Calcineurin freigesetzt, was zur Aktivierung von Calcineurin führt (Mancini und Toker 2009). Aktiviertes Calcineurin wird seiner Funktion als Serin/Threonin-Phosphatase gerecht und dephosphoryliert SP-Regionen der NHR-Domäne von NFAT im Zytoplasma, wodurch dessen nukleäre Lokationssequenz freigelegt wird. NFAT transloziert hierdurch in den Zellkern und kann dort als Transkriptionsfaktor fungieren (Mancini und Toker 2009; Buchholz und Ellenrieder 2007). Die Hemmung von NFAT durch Inhibition von Calcineurin wird pharmakologisch mittels Cyclosporin A (CsA) und FK506 (Tacrolimus) genutzt. CsA und Tacrolimus bilden hierfür Komplexe mit Cyclophilin A bzw. FKPB12, welche direkt an Calcineurin binden und hierdurch die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin hemmen (Liu *et al.* 1991; Mancini und Toker 2009). Endogen kann die Aktivität von NFAT mittels direkter Phosphorylierung durch Exportkinasen und Erhaltungskinasen gehemmt werden. Exportkinasen wie die Serin/Threonin-Kinase GSK3 (Glykogensynthase-Kinase 3) und CK-1 (Casein-Kinase-1) phosphorylieren die SP- und SRR-Regionen der NHR-Domäne von NFAT und vermitteln dadurch dessen Export ins Zytosol (Beals *et al.* 1997). Die Aktivität von NFAT wird also durch ein Netzwerk von Phosphatasen und Kinasen reguliert, welche den Phosphorylierungsstatus und damit die Lokalisation von NFAT bestimmen (Mancini und Toker 2009).

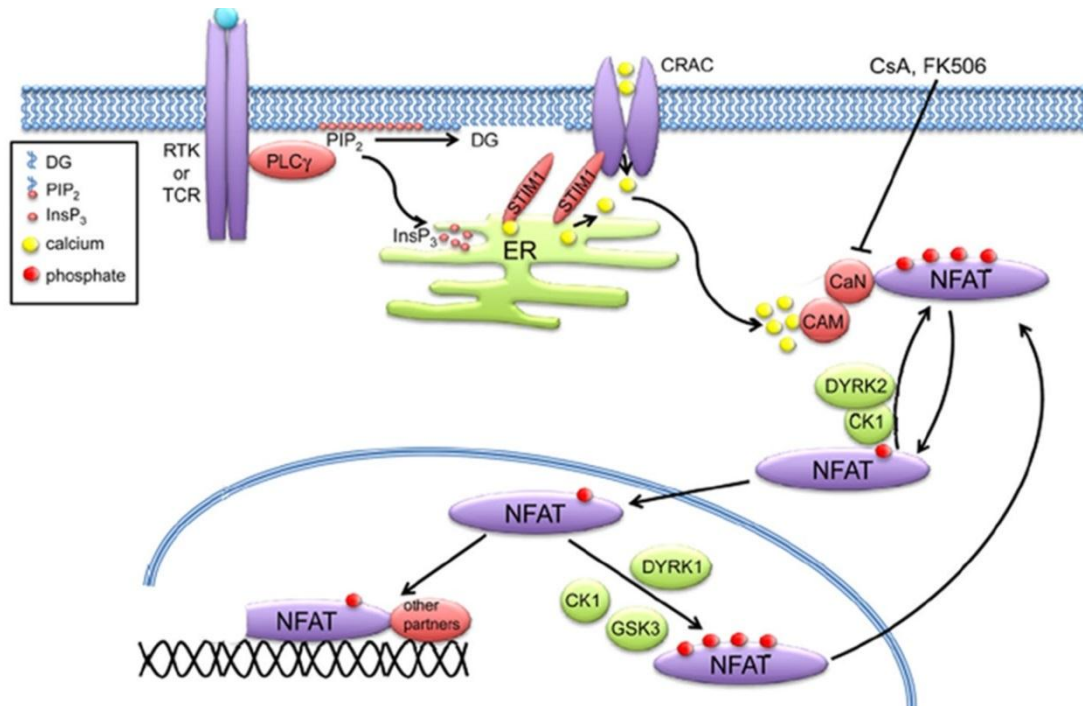


Abb. 5: Der Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-Signalweg (Mancini und Toker 2009). Durch Bindung von Liganden an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und den T-Zell-Rezeptor (TCR) wird die Phospholipase $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) aktiviert, was zur Freisetzung von Inositol-1,2,4-trisphosphat (InsP_3) führt. InsP_3 steigert gemeinsam mit STIM1 die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Hierdurch werden *Calcium release activated channels* (CRACs) geöffnet, was zu einem kontinuierlichen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} führt. Calmodulin (CAM) bindet an eine Calmodulin-Bindungsstelle von Calcineurin (CaN), welche durch Ca^{2+} freigelegt wird. Calcineurin katalysiert daraufhin die Dephosphorylierung von zytoplasmatischem NFAT. Die Dephosphorylierung von NFAT führt zu dessen Translokation in den Zellkern und Aktivierung als Transkriptionsfaktor gemeinsam mit Partnerproteinen. Exportkinasen und Erhaltungskinasen wie GSK3, CK-1 und DYRK führen durch Phosphorylierung von NFAT zu dessen Translokation ins Zytosol. Pharmakologisch kann die Dephosphorylierung und Aktivierung von NFAT durch Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) gehemmt werden.

Als Transkriptionsfaktor reguliert NFAT seine Zielgene durch direkte Bindung an deren Promotoren und Enhancer. Hierbei erkennt NFAT die Konsensussequenz GGAAA und bindet an die DNA meist in Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, als Homo- oder Heterodimer (Rao *et al.* 1997; Mancini und Toker 2009). Zudem kann NFAT die Transkription seiner Zielgene durch Interaktion mit Histondeacetylasen regulieren (Koenig *et al.* 2010b). In der Regel transaktiviert NFATc1 seine Zielgene in Kooperation mit Partnerproteinen, welche dessen DNA-Bindung stabilisieren und spezifizieren. Im Pankreaskarzinom wurde der onkogene Transkriptionsfaktor STAT3 als ein wichtiges Partnerprotein von NFATc1 identifiziert (Baumgart *et al.* 2014).

1.4.3 Die Rolle von NFATc1 im Pankreaskarzinom

Die Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie wurden im Jahre 1988 erstmals als wichtige Vermittler der Aktivierung von T-Lymphozyten beschrieben. Heute weiß man, dass NFAT nicht nur in Immunzellen, sondern ubiquitär exprimiert wird (Mancini und Toker 2009). So sind die verschiedenen NFAT-Isoformen an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen verschiedener Gewebe, wie der Skelettmuskelzellen, Keratinozyten und des kardiovaskulären Systems beteiligt (Chang *et al.* 2004; Graef *et al.* 2001; Friday *et al.* 2000; Mammucari *et al.* 2005). Auch in der Entstehung und Progression verschiedener Krebsformen spielen die einzelnen Isoformen eine Rolle. Eine der ersten Studien, die NFATc1 onkogene Effekte zuschrieben, wurde von Neal und Kollegen im Jahr 2003 durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass die konstitutive Aktivierung von NFATc1 zu einer Zelltransformation von 3T3-L1-Fibroblasten führt (Neal und Clipstone 2003). Während man lange Zeit annahm, dass die einzelnen Isoformen der NFAT-Familie redundante Rollen erfüllen, konnten Robbs und Kollegen den Isoformen NFATc1 und NFATc2 antagonistische Funktionen zuschreiben. Sie zeigten, dass in NIH 3T3-Fibroblasten NFATc1 als Onkogen für eine vermehrte Proliferation und Transformation verantwortlich war, während NFATc2 als Tumorsuppressor Zellzyklusarrest und Apoptose förderte (Robbs *et al.* 2008). Im Pankreaskarzinom findet sich eine Überexpression beider Isoformen. Buchholz und Kollegen konnten eine nukleäre Lokalisation von NFATc1 in 16 von 23 humanen Pankreaskarzinomgeweben beobachten (Buchholz *et al.* 2006). Ebenso war eine nukleäre Expression von NFATc2 in 83 % der untersuchten invasiven Pankreaskarzinome nachweisbar (Baumgart *et al.* 2012). Die Expression von NFATc1 und NFATc2 im Pankreaskarzinom korreliert mit einem aggressiven Phänotyp (Baumgart *et al.* 2012). Einige der Mechanismen durch die NFAT zur Progression von malignen Tumoren beiträgt sind bereits verstanden. So reguliert NFATc1 die zellzyklusregulierenden Gene CDK4, CDK6 und Cyclin D, was zu einem akzelerierten Zellzyklus in der G1-Phase führt (Koenig *et al.* 2010a). Außerdem fungiert NFAT als Transkriptionsfaktor des Protoonkogens c-Myc, einem Master-Transkriptionsfaktor der G1-Progression. Nach *in vivo*- und *in vitro*-Depletion von NFAT wurde eine verminderte Expression von c-Myc, ein G1-Arrest sowie ein

reduziertes Tumorwachstum beobachtet (Buchholz *et al.* 2006; Koenig *et al.* 2010b; Hessmann *et al.* 2015).

1.4.4 Transgene Mauslinien

Die AG Ellenrieder hat bereits in verschiedenen transgenen Mausmodellen beobachtet, dass eine pankreasspezifische konstitutive Aktivierung von NFATc1 die Pankreaskarzinogenese beeinflusst. Hierzu wurde eine Mauslinie generiert, in welcher NFATc1 konstitutiv nukleär (*c.n.NFATc1*) und somit aktiv ist. In den SRR-1 und SP-1 Regionen von NFATc1 wurde an 13 Loci die Aminosäure Serin gegen Alanin ausgetauscht, um den nukleären Export und somit die Inaktivierung von NFATc1 zu verhindern (Abb. 6) (Dissertation Julius Nikorowitsch, 2013).

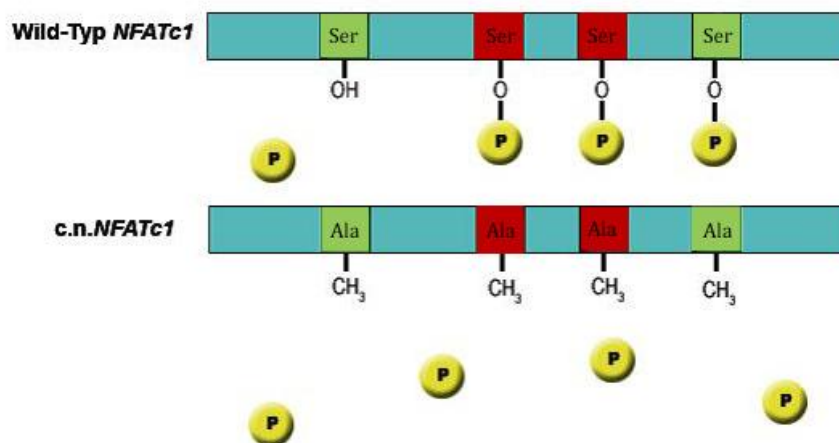


Abb. 6: Schematische Darstellung des Genkonstrukts für c.n.NFATc1 (Modifiziert nach Nikorowitsch 2013). grün: Serin-reiche Region, rot: Serin-Prolin-reiche Region. Der Austausch von Serin gegen Alanin an 13 verschiedenen Loci verhindert die Phosphorylierung von c.n.NFATc1, wodurch dieses im aktiven Zustand im Nukleus verbleibt.

Dieses Konstrukt wurde mit einem Hämagglutinin (HA)-Marker sowie einem loxP-Stop-loxP-Konstrukt versehen und in das erste Intron des Genlokus *Rosa26* eingebracht. Die Aktivierung der genetischen Veränderungen erfolgte durch ein pankreasspezifisches Cre/loxP-System. Hierfür wurde die c.n.NFATc1-Maus mit den Mauslinien p48-Cre bzw. Pdx1-Cre gekreuzt (Baumgart *et al.* 2014). Die p48-Cre Rekombinase wird durch Kopplung an den p48-Ptf1-Promotor in das Genom der Maus eingebaut. Der Transkriptionsregulator Ptf1 (Pancreas transcription factor 1) und dessen DNA-bindende Untereinheit p48 spielen eine Rolle in der Entwicklung des exokrinen Pankreas. In der erwachsenen Maus findet sich p48 lediglich in Azinuszellen (Hingorani *et al.* 2003). Daher wird der p48-Ptf1-

Promotor sowie der Promotor Pdx1 häufig zur pankreasspezifischen Aktivierung des Cre-Enzyms verwendet (Gu *et al.* 2002; Hingorani *et al.* 2003). Die Cre-Rekombinasen entfernen das loxP-Stop-loxP-Konstrukt, sodass *c.n.NFATc1* sowie HA transkribiert werden können. Neben der *c.n.NFATc1*;Cre-Maus, welche zu einer verstärkten Proliferation und Ausbildung von PanIN-Läsionen und vereinzelt PDACs führte, kreierte die AG Ellenrieder zudem eine transgene Maus, bei welcher die konstitutive Aktivierung von NFATc1 mit einer onkogenen Mutation von *Kras* kombiniert wurde. Diese *c.n.NFATc1*;Kras^{G12D};Cre (NKC)-Mäuse bildeten im Vergleich zu Mäusen mit alleiniger Kras^{G12D}-Mutation regelhaft Pankreaskarzinome aus. Die hierbei beobachteten Tumore zeigten die gesamte Bandbreite aller Differenzierungsgrade (Abb. 7) (Dissertation Julius Nikorowitsch, 2013).

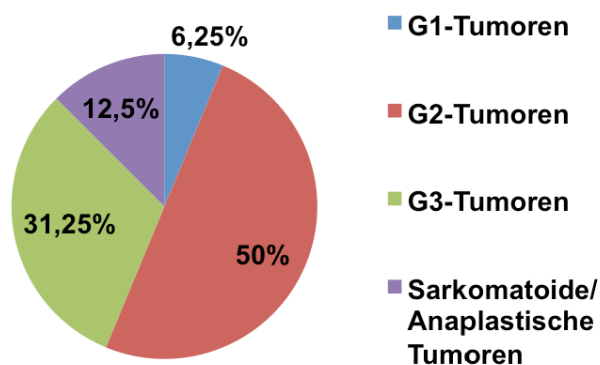


Abb. 7: Differenzierungsgrade muriner Pankreaskarzinome von transgenen Mäusen mit dem Genotyp NKC (*c.n.NFATc1*, Kras^{G12D}, Pdx1-Cre) (Dissertation Julius Nikorowitsch, 2013).

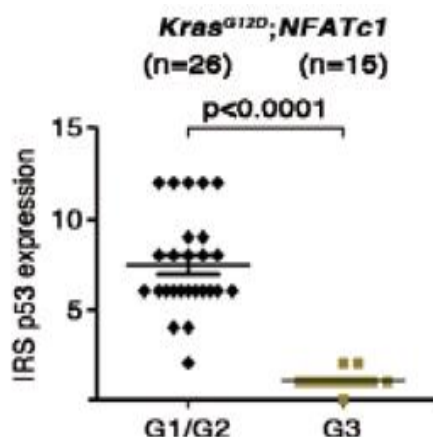


Abb. 8: Immunreaktiver Score IRS von p53 in unterschiedlich differenzierten Pankreaskarzinomen transgener Mäuse mit dem Genotyp NKC (*c.n.NFATc1*, Kras^{G12D}, Pdx1-Cre) (Singh *et al.* 2015).

Zudem konnte die AG Ellenrieder feststellen, dass in diesem Mausmodell ein schlecht differenzierter Phänotyp mit dem endogenen Verlust des Tumorsuppressors p53 einhergeht (Abb. 8)(Singh *et al.* 2015). Dies führte zu der Hypothese, dass NFATc1 auf dem Boden einer Kras-Mutation und nach Verlust des Tumorsuppressors p53 tumorspezifische Programme reguliert, die in einer schlechten Differenzierung resultieren. Um dies zu evaluieren wurde eine weitere Mauslinie generiert: Eine Mauslinie, welche neben der konstitutiven Aktivierung von NFATc1 und der onkogenen Mutation von *Kras* eine Mutation im *Trp53*-Gen trug. Zur Aktivierung der genetischen Veränderung wurde hier eine p48 gekoppelte Cre-Rekombinase verwendet. Diese KNPC-Mäuse zeigten eine stark akzelerierte Karzinogenese mit sehr schlecht differenzierten Karzinomen (Singh *et al.* 2015).

1.5 Stammzellähnliche Tumorzellen und deren Regulatoren

1.5.1 Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften

Die meisten Tumorgewebe sind aus einer heterogenen Gruppe von Tumorzellen aufgebaut. Während dies früher durch die Mikroumgebung der Tumorzellen und durch die Koexistenz multipler genetischer Subklone erklärt wurde, entstand in den vergangenen Jahren die Hypothese einer Subpopulation von Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften. Diese Tumorzellen sollen, wie normale Stammzellen, die Fähigkeit zur Differenzierung und Selbsterneuerung durch Zellteilung besitzen. Dieses Modell wurde erstmals im Rahmen der akuten myeloischen Leukämie beschrieben und in den vergangenen Jahren auf solide Tumore ausgeweitet (Bonnet und Dick 1997; Dalerba *et al.* 2007). Im Jahr 2007 wurden von verschiedenen Autoren solche stammzellähnlichen Tumorzellen im Pankreaskarzinom identifiziert. (Li *et al.* 2007; Hermann *et al.* 2007). Zur Frage nach der Herkunft der Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften existieren zwei Theorien: Anfangs wurde angenommen, dass diese Tumorzellen aus normalen Stammzellen entstehen, da diese viele gemeinsame Eigenschaften zeigten. Beispielsweise tragen sowohl normale Stammzellen als auch stammzellähnliche Tumorzellen die Oberflächenmarker CD34⁺ und CD38⁻ (Bonnet und Dick 1997; Singh und Settleman 2010). Lange Zeit ging man davon aus, dass differenzierte Gewebe nicht in der Lage sind zu entdifferenzieren. Diese langjährige Meinung

wurde von Shin'ya Yamanaka im Jahr 2006 revidiert, wofür dieser im Jahr 2012 den Nobelpreis für Medizin erhielt. Yamanaka war der Erste, dem es gelang pluripotente Stammzellen aus differenzierten Fibroblasten herzustellen. Die dabei entstandenen iPS (*induced pluripotent stem*)-Zellen zeigten die Morphologie und Eigenschaften embryonaler Stammzellen (Takahashi und Yamanaka 2006). Dies untermauert die These, dass stammzellähnliche Tumorzellen aus differenzierten Tumorzellen entstehen können. Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften herstellen (Mani *et al.* 2008; Santisteban *et al.* 2009; Morel *et al.* 2008; Satoh *et al.* 2015). EMT ist ein Transdifferenzierungsprogramm, welches in der embryonalen Entwicklung eine Rolle spielt (Singh und Settleman 2010). Zellen, die EMT durchlaufen, verlieren ihren epithelialen Phänotyp, inklusive Zell-Zell-Adhäsionen, Polarität und Immobilität. Die Zellen erhalten einen mesenchymalen Phänotyp, was in der Karzinogenese zum Erlangen von Motilität und Invasivität sowie Vermeidung von Apoptose führt (Polyak und Weinberg 2009). Regulatoren von EMT sind die Zinkfingerproteine Snail, Slug, Zeb1, Zeb2 und Twist, welche als transkriptionelle Repressoren die Transkription des epithelialen Adhäsionsproteins E-Cadherin unterdrücken (Singh und Settleman 2010). Der EMT-Regulator Snail induziert seinerseits die Expression der Stammzellfaktoren Sox2 und Oct4 (Zhou *et al.* 2014). Verschiedene Signalwege sind in stammzellähnlichen Tumorzellen aktiviert, hierunter die Signalwege Hedgehog und Notch, welche ihrerseits auch als Regulatoren der EMT gelten (Merchant und Matsui 2010; Abel *et al.* 2014; Wang *et al.* 2009).

1.5.2 Regulatoren der stammzellähnlichen Tumorzellen

Bei der Generierung der iPS-Zellen durch Yamanaka waren mehrere Faktoren essenziell: Oct3/4 (*Octamer binding transcription factor 3/4*), Sox2 (*Sex Determining Region Y-Box 2*), c-Myc, Klf4 (*Kruppel-like factor 4*) sowie das Homöoboxprotein Nanog (Takahashi und Yamanaka 2006; Aoi *et al.* 2008). Ein weiteres Protein, welches für die Erhaltung von Stammzellen benötigt wird ist das Polycomb-Protein Bmi1, welches als Transkriptionsrepressor Senescence unterdrückt (Park *et al.* 2004). Diese Stammzellfaktoren spielen auch in der Aufrechterhaltung des stammzellähnlichen Phänotyps von Tumorzellen eine Rolle.

Die Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors Sox2 wurde in verschiedenen Tumorarten, wie dem Plattenepithelkarzinom der Lunge, dem Prostatakarzinom, dem Medulla- und Glioblastom, dem Osteosarkom sowie dem Pankreaskarzinom beobachtet (McCaughan *et al.* 2010; Sattler *et al.* 2000; Cox *et al.* 2012; Basu-Roy *et al.* 2012; Sanada *et al.* 2006). Die Expression von Sox2 geht hierbei mit einem entdifferenzierten Phänotyp sowie einer schlechten Prognose einher (McCaughan *et al.* 2010; Cox *et al.* 2012; Sanada *et al.* 2006). Eine kürzlich durchgeführte Studie von Herreros-Villanueva, welche die Rolle von Sox2 im Pankreaskarzinom evaluierte, konnte eine starke Expression von Sox2 in schlecht differenzierten Pankreaskarzinomen zeigen (Abb. 9) (Herreros-Villanueva *et al.* 2013).

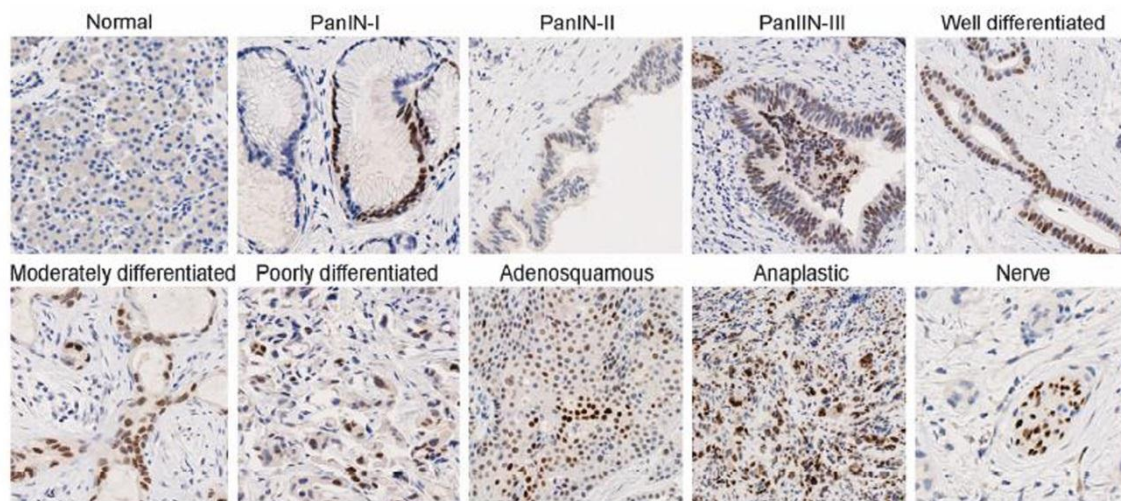


Abb. 9: Expression von Sox2 in PanIN-Läsionen und unterschiedlich differenzierten humanen Pankreaskarzinomen (Herreros-Villanueva *et al.* 2013).

Neben Sox2 wurde auch die Expression von Oct4, c-Myc, Nanog und Bmi1 in stammzellähnlichen Tumorzellen des Pankreaskarzinoms und anderen Karzinomen beschrieben (Wang *et al.* 2013; Lu *et al.* 2013; Shankar *et al.* 2011; Proctor *et al.* 2013; Herreros-Villanueva *et al.* 2014; Liu *et al.* 2013). Histologisch schlecht differenzierte Tumore zeigen eine hohe Expression von Stammzellfaktoren. So brachten verschiedene Studien die Expression der Stammzellfaktoren Nanog, Oct4, Sox2 und c-Myc mit einem geringen Differenzierungsgrad sowie einer schlechten Prognose in Verbindung (Ben-Porath *et al.* 2008; Lu *et al.* 2013).

1.5.3 Stammzellähnliche Tumorzellen und Chemoresistenz

Zu der schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms trägt die ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapie bei. Man unterscheidet bei der Chemoresistenz zwei Formen: Zum einen die *de novo* Chemoresistenz, bei der die Tumore intrinsisch resistent gegenüber der Chemotherapie sind und auf diese nicht ansprechen. Zum anderen die erworbene Chemoresistenz, bei der Patienten nach initialem Ansprechen ein Rezidiv erleiden (Singh und Settleman 2010). Die erworbene Chemoresistenz wird erklärt durch resistente Tumorzellen, welche nach Chemotherapie zurückbleiben und zu einem Rezidiv führen können. Im Pankreaskarzinom wurde nach Therapie mit Gemcitabine ein Anstieg an stammzellähnlichen Tumorzellen sowie EMT- und Stammzellregulatoren beobachtet (Zhou *et al.* 2008; Hermann *et al.* 2007; Quint *et al.* 2012). Man geht davon aus, dass diese stammzellähnlichen Tumorzellen aus verschiedenen Gründen resistent gegenüber Chemotherapie sind: hohe Level an anti-apoptotischen Molekülen, Widerstand gegenüber DNA-Schäden sowie effektive DNA-Reparaturmechanismen (Zhou *et al.* 2009). Zudem können Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften ABC (ATP-Binding-Cassette)-Pumpen exprimieren, welche die Chemotherapeutika aus der Zelle befördern (Zhou *et al.* 2008). Um eine vollständige Remission zu erreichen, müssen also auch diese Zellen durch Chemotherapie erreicht werden. Hierzu wurden bereits verschiedene Studien durchgeführt, wobei gezielte Antikörper gegen Oberflächenmarker, wie CD44 und CD133 oder kompetitive Antagonisten an ABC-Pumpen eingesetzt wurden (Deonarain *et al.* 2009; Kuhnle *et al.* 2009). Eine weitere Möglichkeit, resistente Pankreastumore für Chemotherapie zu sensitivieren, wäre die Hemmung der wichtigsten Regulatoren dieser stammzellähnlichen Tumorzellen. Um dies zu ermöglichen, müssen die molekularen Mechanismen, welche zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften von Tumorzellen im Pankreaskarzinom führen, besser verstanden werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms ist unter anderem in seinem aggressiven und entdifferenzierten Phänotyp begründet. Die Stammzeleigenschaften der Tumorzellen tragen zur Fähigkeit der Selbsterneuerung sowie zur Entdifferenzierung bei. Zudem führen sie zu einer ausgeprägten Chemoresistenz, wodurch herkömmliche Chemotherapeutika nur geringe Therapieerfolge erzielen. Der Tumorsuppressor p53 liegt in 75 % aller humanen Pankreaskarzinome in mutierter Form vor und wurde in den vergangenen Jahren häufiger mit der Regulation von Differenzierungsmechanismen in Verbindung gebracht. Der Transkriptionsfaktor NFATc1 ist in 70 % der humanen Pankreaskarzinome aktiviert und führte in Mausmodellen zusammen mit Mutationen von p53 und Kras zu sehr schlecht differenzierten Tumoren. Inwiefern der Verlust der tumorsuppressiven Funktion von p53 gepaart mit einer Aktivierung von NFATc1 zu diesem entdifferenzierten und aggressiven Phänotyp beiträgt, wurde in dieser Arbeit umfassend mechanistisch untersucht.

Hierbei standen die folgenden Fragen im Mittelpunkt der Arbeit:

- Führt der Verlust der tumorsuppressiven Funktion von p53 zu Entdifferenzierung *in vivo* und *in vitro*?
- Wie werden die Effekte von p53 auf die Differenzierung vermittelt?
- Trägt die Aktivierung von NFATc1 zur Induktion von Stammzeleigenschaften des Pankreaskarzinoms bei?
- Wie vermittelt NFATc1 seine Effekte auf Stammzeleigenschaften?
- Kann die Chemoresistenz von Pankreastumorzellen durch Hemmung von NFATc1 vermindert werden?

3 Material

3.1 Zelllinien und verwendete Medien

3.1.1 Murine und humane Pankreaskarzinomzelllinien und deren Medien

Name	Abstammung	Herkunft	Medium
Murine Zelllinien			
NKC II KNPC 001 KNPC del3	Murines Pankreaskarzinom	AG Ellenrieder, Gastroenterologie, Philipps-Universität Marburg	DMEM + 10 % FCS + 1 % NEAA + 1 % Pen/Strept
Humane Zelllinien			
L3.6	Humanes Pankreaskarzinom	AG Daniel Billadeau, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota	MEM + 10 % FCS + 1 % Na Pyruvat + 1 % NEAA + 1 % Glutamin
Panc-1	Humanes Pankreaskarzinom	European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Großbritannien	DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strept
PDAC 10/11/11	Humanes Pankreaskarzinom	AG Daniel Billadeau, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota	1 x DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strept + 25 mM HEPES = 12,5 ml in 500 ml (1 M Stock)

3.1.2 Medium zur Durchführung des Sphere-Assays

Sphere Medium	
92 ml	DMEM
1 ml	Insulin 100 x
4 ml	BSA 10 %
1 ml	N2 Supplement 10 x
200 µl	EGF 1 µl/ml
10 µl	bEGF 100 µg/ml
2 ml	B27

3.1.3 Medium zur Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium	
47,5 ml	FCS
2,5 ml	DMSO

3.2 Puffer und Lösungen

3.2.1 Puffer zur Isolierung von Tumorzellen aus Gewebe

Waschpuffer	
700 ml	HBSS
3,3 ml	HEPES
20 ml	MEM Aminosäuren [50 x]
10 ml	MEM NEAA [100 x]
10 ml	Natriumpyruvat [100 mM]
135 µl	Magnesiumchlorid [200 mM]
80 µl	Calciumchlorid [100 mM]
10 ml	Natriumcitrat [0,68 M]
2,1 ml	Glycerin
Mit H ₂ O auf 1 l auffüllen	
Verdauungspuffer	
30 ml	Waschpuffer
600 µl	Liberase Blendzymes
150 µl	Trypsininhibitor

3.2.2 Puffer und Lösungen für Proteinexpressionsanalysen

3.2.2.1 Puffer zur Gewinnung und Aufbereitung von Protein

Lysepuffer für Gesamtzelllysate	
50 mM	HEPES
150 mM	NaCl
1 mM	EGTA
100 mM	Natriumfluorid
10 mM	Natriumpyrophosphat
	H ₂ O
0,04 %	25 x Complete (erst vor Gebrauch hinzufügen)
Bradford Protein Assay	
50 ml	Bio Rad Protein Assay
200 ml	destilliertes Wasser
5 x Laemmli	
225 mM	Tris-HCl
50 %	Glycerin
20 %	SDS
10 mM	DTT
0,02 %	Bromphenolblau
5 %	β-Mercaptoethanol

3.2.2.2 Puffer für SDS-Gelelektrophorese

SDS Trenngelpuffer	
1,5 M	Tris Base
0,4 %	SDS
	H ₂ O
	→ pH 8,8
SDS Sammelgelpuffer	
0,5 M	Tris Base
0,4 %	SDS
	H ₂ O
	→ pH 8,8

Laufpuffer (10 x)	
288 g	Glycin
60,6 g	Tris
20 g	SDS

3.2.2.3 Puffer für Western Blot

10 x Blottingpuffer	
0,25 M	Tris
1,92 M	Glycin
1 x Blottingpuffer	
100 ml	Trans-Blot-Puffer
200 ml	Methanol
700 ml	H ₂ O
10 x TBS	
0,2 M	Tris
1,37 M	NaCl
	→pH 7,6
1 x TBS	
100 ml	TBS
900 ml	H ₂ O
1 ml	Tween 20
Blockingpuffer	
5 g	Milchpulver
200 ml	1 x TBST
1 ml	Tween 20

3.2.3 Puffer für Chromatinimmunpräzipitation

Lysepuffer I	
5 mM	PIPES (pH 8,0)
85 mM	Kaliumchlorid
0,5 %	NP-40
0,04 %	25 x Complete (erst vor Gebrauch hinzufügen)

RIPA-Puffer	
50 mM	Tris (pH 7,4)
150 mM	NaCl
10 nM	EDTA
10 nM	EGTA (pH 7,2)
1 %	Triton-X-100
1 %	Natriumdesoxycholat
0,1 %	SDS
	H ₂ O
0,04 %	25 x Complete (erst vor Gebrauch hinzufügen)
Waschpuffer I	
20 mM	Tris (pH 8,1)
150 mM	NaCl
2 mM	EDTA
0,1 %	SDS
0,1 %	Triton-X-100
Waschpuffer II	
20 mM	Tris (pH 8,1)
500 mM	NaCl
2 mM	EDTA
0,1 %	SDS
0,1 %	Triton-X-100
Waschpuffer III	
10 mM	Tris (pH 8,1)
250 mM	Lithiumchlorid
1 mM	EDTA
1 %	SDS
1 %	NP-40

3.2.4 Puffer für Genotypisierung transgener Mäuse

PBND	
50 mM	Kaliumchlorid
10 mM	Tris-HCl
2,5 mM	Magnesiumchlorid
0,45 %	NP-40
0,45 %	Tween 20
TBE (5 x)	
108 g	Tris Base
55 g	Borsäure
40 ml	0,5 M EDTA
	Auf 2 l mit H ₂ O auffüllen
Farbpuffer	
30 %	Glycerin
0,1 mM	EDTA
0,25 %	Bromphenolblau
	H ₂ O

3.2.5 Puffer für Immunhistochemie

PBS-Puffer	
214 ml	Kaliumhydrogenphosphatlösung
536 ml	Natriumhydrogenphosphatlösung
45 g	NaCl
	→ pH 7,4
TE-Puffer	
20 mM	Tris (pH 8,0)
1 mM	EDTA
DAB-Lösung	
200 mg	DAB
200 ml	TBS
100 µl	H ₂ O ₂

3.3 Chemikalien und Biochemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH
Agarose	Carl Roth GmbH
APS	Merck
Aqua ad iniectabilia	Braun
B27	Life Technologies
bEGF	Pepro Tech
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	SIGMA
BSA (10mg/ml)	Sigma-Aldrich®
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH
Chloroform	Merck
Colorless GoTaq Reaction Buffer	Promega
CompleteProteinaseinhibitor-Tablette	Roche
Cyclosporin A	SIGMA
DAB	Carl Roth GmbH
DMEM	Gibco
DMSO	Sigma-Aldrich®
DNase I	New England Biolabs
dNTPs	Sigma-Aldrich®
DTT	Serva Electrophoresis
Dulbecco's PBS	GE Healthcare
EDTA	Carl Roth GmbH
EGF	Sigma-Aldrich®
EGTA	Sigma-Aldrich®
Eosin	Sigma-Aldrich®
Essigsäure	Merck
Ethanol	Sigma-Aldrich®
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH

Name	Hersteller
FCS	PAA Laboratories GmbH
Formaldehyd	Sigma-Aldrich®
Gelatine	Sigma-Aldrich®
Gemcitabine	Kliniksapotheke der Uni Marburg
GeneRuler™ 1kB DNA Ladder	Fermentas GmbH
Glutamin	Gibco
Glycerin	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
GoTaq DNA-Polymerase	Promega
HBSS	Gibco
HEPES	Carl Roth GmbH
H ₂ O ₂	Carl Roth GmbH
Hämatoxylin solution	SIGMA
Insulin-100-X	Gibco
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Merck
Liberase Blendzymes	Roche
Lipofectamin	Invitrogen
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich®
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid	SIGMA
MEM	Gibco
Methylbenzoat	Carl Roth GmbH
Methanol	Sigma-Aldrich®
Midori Green	Nippon Genetics
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Mimics	Life Technologies
Multiscribe™ RT Enzyme	Life Technologies
N2 Supplement	Life Technologies
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH

Name	Hersteller
NaCl isotonische Lösung	Diaco
Natriumcitrat	Merck
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich®
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich®
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumpyrophosphat	SIGMA
Natriumpyruvat	Carl Roth GmbH
Non essential Amino acids	PAA Laboratories GmbH
NP-40	Sigma-Aldrich®
Paraffin	Vogel GmbH
Pen/Strept	SIGMA
PageRuler™ Proteinmarker	Fermentas GmbH
PIPES	SIGMA
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich®
PMSF	Roche
Protein A Agarose	Millipore
Protein G Agarose	Millipore
Proteinase K	Proteinase K
Protein Assay	BIO RAD
Qiazol Lysis Reagent	QIAGEN
RNase A	Sigma-Aldrich®
Roticlear	Carl Roth GmbH
Rotimount	Carl Roth GmbH
Salzsäure	Thermo Fisher chemical
siLentFect™	BioRad
SDS	Carl Roth GmbH
RNase-Inhibitor	Applied Biosystems
SYBR GREEN	Applied Biosystems
TaqMan® Universal Master Mix II	Life Technologies
TEMED	Carl Roth GmbH
Tris Base	ACROS Organic

Name	Hersteller
TRIS Hydrochlorid	Carl Roth GmbH
Triton-X-100	Carl Roth GmbH
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich®
Tween ® 20	Sigma-Aldrich®
Western Lightning™ Plus ECL Oxidizing Reagent Plus	Perkin Elmer
Western Lightning™ Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	Perkin Elmer
Western Lightning™ Ultra ECL Oxidizing Reagent Plus	Perkin Elmer
Western Lightning™ Ultra ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	Perkin Elmer
Xylol	Sigma-Aldrich®

3.4 Kits

Name	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit	Roche
DNeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen
miRNeasy Mini Kit	Qiagen
Omniscript®RT Kit	Qiagen
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories

3.5 Antikörper

3.5.1 Antikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	DAB-Dauer	Hersteller
CK-19	1 : 50	10 min	Santa Cruz
HA	1 : 100	4 min	Cell signaling
p53	1 : 600	10 min	Leica

3.5.2 Antikörper für Western Blot

3.5.2.1 Primärantikörper für Western Blot

Antikörper	Art	Verdünnung	Größe (kDa)	Hersteller
β-Actin HRP		1 : 20000	42	Santa Cruz
Bmi1	Maus	1 : 1000	40-44	Millipore
HA	Maus	1 : 1000	60	Cell signaling
Klf4	Kaninchen	1 : 1000	50	abcam
Nanog	Kaninchen	1 : 1000	42	Cell signaling
NFATc1	Maus	1 : 1000	100-115	abcam
Oct4	Kaninchen	1 : 000	43	abcam
p53	Kaninchen	1 : 1000	53	Cell signaling
Sox2	Kaninchen	1 : 500	43-34	abcam

3.5.2.2 Sekundärantikörper für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen HRP	2 : 10000	Cell signaling
Maus HRP	4,5 : 10000	Cell signaling

3.5.3 Antikörper für Chromatinimmunpräzipitation

Antikörper	Volumen	Herkunft	beads	Hersteller
IgG	1 µl	Kaninchen	A	Santa Cruz
IgG	1 µl	Maus	G	Santa Cruz
NFATc1 (H110)	16 µl	Kaninchen	A	Santa Cruz
RNA-Polymerase II	4 µl	Maus	G	Millipore

3.6 Primer

3.6.1 Primer für qPCR

3.6.1.1 Murine Primer für qPCR

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>Bmi1 forward</i>	5'-ctc gag gtt ttc atg gtg tta cc-3'	Biomers
<i>Bmi1 reverse</i>	5'-cct caa acg cac tct cag aag taa g-3'	Biomers
<i>Klf4 forward</i>	5'-tga cta tgc agg ctg tgg ca-3'	Biomers
<i>Klf4 reverse (N.O.K)</i>	5'ttt cta caa gaa agc tgg gt-3'	Biomers
<i>Nanog forward</i>	5'-cag gtg ttt gag ggt agc tc-3'	Biomers
<i>Nanog reverse</i>	5'-cgg ttc atg gta cag tc-3'	Biomers
<i>NFATc1 forward</i>	5'-gcc ttt tgc gag cag tat ct-3'	Biomers
<i>NFATc1 reverse</i>	5'-gct gcc ttc cgt ctc ata gt-3'	Biomers
<i>Oct4 forward</i>	5'-tct ttc cac cag gcc ccc ggc tc-3'	Biomers
<i>Oct4 reverse</i>	5'-tgc ggg cgg aca tgg gga gat cc-3'	Biomers
<i>p53 forward</i>	5'-tgg acc ctg gca cct aca at-3'	Biomers
<i>p53 reverse</i>	5'-gga aag tag gcc ctg gag gat-3'	Biomers
<i>Sox2 forward</i>	5'-aag ggt tct tgc tgg gtt tt-3'	Biomers
<i>Sox2 reverse</i>	5'- aaa cgg tct tg-3' cca cga-3'	Biomers
<i>xs13 forward</i>	5'-tgg gca aga aca cca tga tg-3'	Biomers
<i>xs13 reverse</i>	5'-agt ttc tcc aga gct ggg ttg t-3'	Biomers

3.6.1.2 Humane Primer für qPCR

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>BMI1 forward</i>	5'-aga tga gtc acc aga ggg atg g-3'	Biomers
<i>BMI1 reverse</i>	5'-cct caa acg cac tct cag aag taa g-3'	Biomers
<i>KLF4 forward</i>	5'-ctc cat tac caa ggt cag tcc -3'	Biomers
<i>KLF4 reverse</i>	5'-gat cgt ctt ccc ctc tt gg-3'	Biomers
<i>NANOG forward</i>	5'-gaa caa ttc aac ctg gag caa c-3'	Biomers
<i>NANOG reverse</i>	5'-gag aat ttg gct gga act gc-3'	Biomers
<i>NFATc1 forward</i>	5'-tgc aag ccg aat tct ctg g-3'	Biomers
<i>NFATc1 reverse</i>	5'-ggg aag gta ggt gaa acg ctg -3'	Biomers
<i>OCT4 forward</i>	5'-aat gtc caa gca gag tca gg-3'	Biomers
<i>OCT4 reverse</i>	5'-agc ctc aaa atc ctc tcg ttg -3'	Biomers
<i>SOX2 forward</i>	5'-ttc aca tgt ccc agc act ac-3'	Biomers
<i>SOX2 reverse</i>	5'-tcc atg ctg ttt ctt act ctc c-3'	Biomers
<i>xs13 forward</i>	5'gtc gga gga gtc gga cga g-3'	Biomers
<i>xs13 reverse</i>	5'- gcc ttt att tcc ttg ttt tgc aaa -3'	Biomers

3.6.2 Primer für Chromatinimmunpräzipitation

3.6.2.1 Humane ChIP Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>SOX2 Promotor +33 for</i>	5'-tca gga gtt gtc aag gca gag a-3'	Biomers
<i>SOX2 Promotor +33 rev</i>	5'-gcc gcc gcc gat gat tgt tat tat -3'	Biomers
<i>SOX2 Promotor -470 for</i>	5'-atg aca cac caa ctc ctg cac t-3'	Biomers
<i>SOX2 Promotor -470 rev</i>	5'-tta aat gag gat ggg acg cgg gaa -3'	Biomers
<i>SOX2 Promotor -1100 for</i>	5'-ttg cgg cca cca cca tgg aaa t-3'	Biomers
<i>SOX2 Promotor -1100 rev</i>	5'-ttt ccg cag tca caa act -3'	Biomers
<i>SOX2 Enhancer -3900 for</i>	5'-tgg tgg tcg tca aac tct gct a-3'	Biomers
<i>SOX2 Enhancer -3900 rev</i>	5'-aat gaa ggc aaa cgg cag gga a-3'	Biomers

3.6.2.2 Murine ChIP Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>SOX2 Enhancer -4200</i>	5'-tct gct ctt cct cgg aat ggt-3'	Biomers

3.6.3 Primer zur Genotypisierung transgener Mäuse

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>p48-Cre forward</i>	5'-tgc tgt ttc act ggt tat gcg g-3'	Biomers
<i>p48-Cre reverse</i>	5'-ttg ccc ctg ttt cac tat cca g-3'	Biomers
<i>Kras^{G12D} forward</i>	5'-agc tag cca cca tgg ctt gag taa gtc tgc g-3'	Biomers
<i>Kras^{G12D} reverse</i>	5'-cct tta caa gcg cac gca gac tct aga -3'	Biomers
<i>c.n.NFATc1 forward</i>	5'-cat gtc tgg gag atg gaa gc-3'	Biomers
<i>c.n.NFATc1 reverse</i>	5'-tct cga gct act tgt cat cg-3'	Biomers
<i>Trp53^{R172H} forward</i>	5'-tag cca cca tgg ctt gag gtc tgc -3'	Biomers
<i>Trp53^{R172H} reverse</i>	5'-ctt gga gac ata gcc aca ctr -3'	Biomers
<i>p53 flox Int 10 for</i>	5'-aag ggg tat gag gga caa gg-3'	Biomers
<i>p53 flox Int 10 rev</i>	5'-gaa gac aga aaa ggg gag gg-3'	Biomers
<i>p53 flox Int 10 for</i>	5'-aag ggg tat gag gga caa gg-3'	Biomers
<i>p53 flox Int1 rev</i>	5'-agc aca tag gag gca gga c-3'	Biomers
<i>Rosa26 forward</i>	5'-ggc gga tca caa gca ata at-3'	Biomers
<i>Rosa26 reverse</i>	5'-gag tct tct ggg cag gct ta-3'	Biomers

3.6.4 miRNA-Primer

Primer	Assay ID	Hersteller
hsa-miR-34a	000426	Applied Biosystems
hsa-miR-200c	002300	Applied Biosystems
U6 snRNA	001973	Applied Biosystems

3.7 Konstrukte

3.7.1 siRNA-Konstrukte

siRNA-Konstrukt	Sequenz	Hersteller
NFATc1 #3	5'-gcg uuu cac gua ccu ucc utt-3'	Ambion
p53 #2	5'-aca gcg ugg ugg uac cuu att -3'	Ambion

3.7.2 Mimics

Mimics	Sequenz	Hersteller
miRNA-34a	5'-ugg cag ugu cuu agc ugg uug u-3'	Ambion
miRNA-200c	5'-uaa uac ugc cgg gua aug aug ga-3'	Ambion

3.7.3 Antagomir

Antagomir	Sequenz	Hersteller
miRNA-34a	5'-ugg cag ugu cuu agc ugg uug u-3'	Ambion
miRNA-200c	5'-uaa uac ugc cgg gua aug aug ga-3'	Ambion

3.8 Labormaterialien

Name	Hersteller
96 Well für BrdU-Assay	Perkin-Elmer
Blottpapier Whatman	Schleicher & Schüll
Corning Platten	Fisher Scientific GmbH
Dako-Pen	Dako
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Einwegnadeln, Spritzen	Greiner-Bio-One
Eppendorfgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Eppendorf
Glaswaren	Schott
Kryoröhrchen 2ml	Greiner Bio-One
Kultivierungsplatten (6 Wells)	Sarstedt
Neubauerzählkammer	Carl Roth GmbH

Name	Hersteller
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll
Objektträger	Menzel-Gläser
Ohrmarken	A. Hartenstein
Parafilm	Greiner Bio-One
Petrischale 3 cm, 10 cm, 20 cm	Thermo Scientific Nunc
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten	
- 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Discovery Comfort
- 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio One
Pipettenspitzen	
Weiß/gelb:	Gilson Diamond
Blau	Greiner Bio One
Platten für Bradfordproteinbestimmung	Sarstedt
Mikropistill	Carl Roth GmbH
Multipipetten	Eppendorf
Multipipettenaufsatz	Eppendorf
PCR-Platten	Applied Biosystems
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Papier für UV-Licht-Entwickler	Mitsubishi Electric
Skalpell	Braun
Spritzen	Braun
Spritzenfilter	Thermoscientific
Zellkulturflasche (50ml, 250ml,500ml)	Greiner-Bio-One
Zellschaber	Sarstedt

3.9 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tuttnauer
Brutschrank WTB Binder	Hereaus Instruments
ChemoCam	Intas
DLReady™ Luminometer	Berthold Technologies
Eismaschine	Ziegra Eis
Einbettmaschine HistoSTAT	Reichert-Jung
Elektrophoresekammer	Bio Rad
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa
Feinwaage	OHAUS
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Gefriertruhe	Heraeus Instruments
Heizblock	Techne AG
Inkubator	Memmert
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifuge Micro 200R	Hettich Zentrifuge
Mikroskop	Olympus
Mikrotom RM 2155	Leica
Mikrowelle	Whirlpool
Multiscan FC Mikroplate Photometer	Thermo Scientific
Nano-Drop®-ND-1000	NanoDrop Technologies
pH-Meter	Mettler-Toledo
Reagenzglasschüttler Reax2000	Heidolph Instruments
Real-Time PCR 7500 Fast	Applied Biosystems
Real-Time PCR StepOnePlus™	Applied Biosystems
Schüttler	Bachofer
Sonifier W 250-D	Branson Digital Sonifier
Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments
Stickstofftank	Tec-Lab
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems

Gerät	Hersteller
Thermal Cycler T100	BioRAD
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trans-Blot-Kammer	BioRad
Trockenschrank	Heraeus
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph Instruments
UV-Scanner	Kaiser
Vakuum Concentrator	Bachofer
Vakuumpumpe	PFEIFFER
Video Graphic Printer	SONY
Videokamera Gel Print 1000i	BioPhotonics
Voltmeter für SDS-Gelelektrophorese	BioRAD
Wasserbad	GFL®
Zentrifugen	
PicofugeTM	Stratagene
Biofuge Pico	Heraeus Instruments
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
Labofuge GL	Heraeus Instruments
Mikro 200R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge 5415C	Eppendorf

3.10 Software

Programm	Hersteller
Photoshop CS4	Adobe
Axio Vision Rel. 4.6	Carl Zeiss
ChemoStar Imager	Intas
Excel 2010	Microsoft®
StepOne™ Software v2.3	Applied Biosystems
Word 2010	Microsoft®

4 Methoden

4.1 Generieren und Charakterisieren der transgenen KNP^{+/-}C-Maus

4.1.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in einer konventionellen Tierhaltung in vollklimatisierten Räumen bei einer Temperatur von 22 °C ± 1 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 55 % ± 10 % und einem zwölfstündigen Hell-/Dunkelzyklus gehalten und gezüchtet. Die Mitarbeiter trugen Einmalhandschuhe, Kopfhauben, Mundschutz und Hygiene-Überschuhe. Alle Materialien wurden vor Verwendung im Tierbereich autoklaviert oder chemisch desinfiziert. Die Mäuse bekamen Holzspäne als Einstreu, Nistmaterial aus Zellstoff und erhielten eine Standarddiät für Mäuse sowie steril filtriertes teilentmineralisiertes Wasser ad libitum. Die Hygieneüberwachung auf Krankheitserreger erfolgte durch zwölfwöchige Untersuchungen nach den Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Zur Zucht der transgenen Mauslinie wurde jeweils ein Männchen mit zwei Weibchen verpaart. Nach 21 Tagen wurden die Jungtiere abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt, mithilfe von Ohrmarken markiert und ein Mausschwanzbiopsat zur Genotypisierung gewonnen. Im Alter von sechs bis acht Wochen wurden geschlechtsreife Tiere des gewünschten Genotyps verpaart.

4.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die Tötung der Versuchstiere wurde durch eine Anzeige der Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken nach § 4 (3) des Tierschutzgesetzes für das Jahr 2013 legitimiert. Die Tötung wurde nur von Mitarbeitern durchgeführt, welche die Sachkunde durch den FELASA B-Kurs erworben hatten.

4.1.3 Versuchstiere

Die transgene Mauslinie LSL-Kras^{G12D} wurde erstmals von Jackson und Kollegen beschrieben und unserer Arbeitsgruppe von der AG Fendrich der Universität Marburg zur Verfügung gestellt (Jackson *et al.* 2001). Die p48-Cre-Mauslinie erhielt die Arbeitsgruppe ebenfalls von der AG Fendrich. Die p53^{-/-}-Mauslinie wurde von der AG Stiewe der Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Die Mauslinie

c.n.NFATc1 wurde von der AG Ellenrieder entworfen und durch Artemis Pharmaceuticals (Köln) generiert.

4.1.4 Zucht und Kreuzung des transgenen Mausmodells KNP^{+/-}C

Die Kreuzung zum Erhalt der transgenen KNP^{+/-}C-Maus erfolgte durch Inzucht nach dem folgenden Kreuzungsschema:

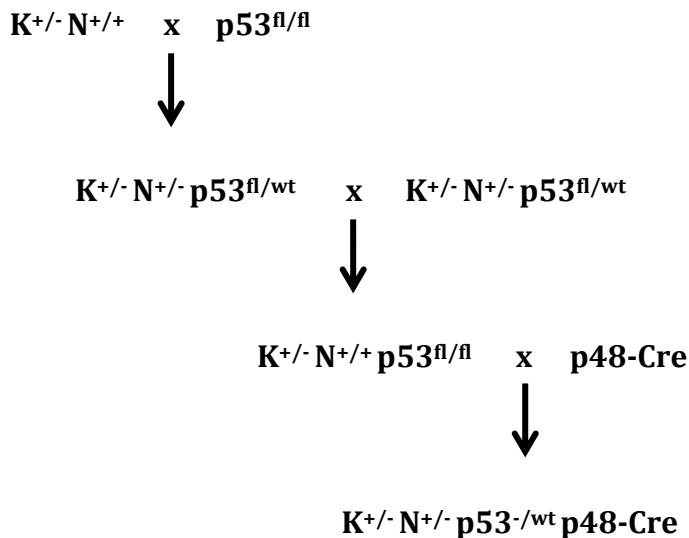


Abb. 10: Kreuzungsschema zum Erhalt der transgenen Maus mit dem Genotyp KNP^{+/-}C

$K^{+/-}$: *Kras*^{G12D} heterozygot, $N^{+/+}$: c.n.NFATc1 homozygot, $N^{+/-}$: c.n.NFATc1 heterozygot, $p53^{fl/fl}$: *p53 flox* homozygot, $p53^{fl/wt}$: *p53 flox* heterozygot, $p53^{-/-}$: *p53-knockout* heterozygot. Mäuse mit dem Genotyp *Kras*^{G12D} heterozygot; c.n.NFATc1 homozygot wurden mit dem Genotyp *p53 flox* homozygot gekreuzt. Die dabei mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % entstehenden Mäuse mit dem Genotyp $K^{+/-} N^{+/-} p53^{fl/wt}$ wurden miteinander verpaart zum Erhalt des Genotyps $K^{+/-} N^{+/+} p53^{fl/fl}$. Dieser wurde im finalen Schritt zur pankreasspezifischen Aktivierung der genetischen Veränderungen mit p48-Cre gekreuzt.

Über mehrere Zwischenschritte wurden Mäuse mit dem Genotyp $K^{+/-} N^{+/+} p53^{fl/fl}$ generiert, welche im finalen Schritt zur Kreuzung mit Mäusen des Genotyps p48-Cre eingesetzt wurden. Erst durch die Rekombinase p48-Cre wurde die Transkription der genetisch veränderten Gene pankreasspezifisch aktiviert. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind in Abb. 11 dargestellt.

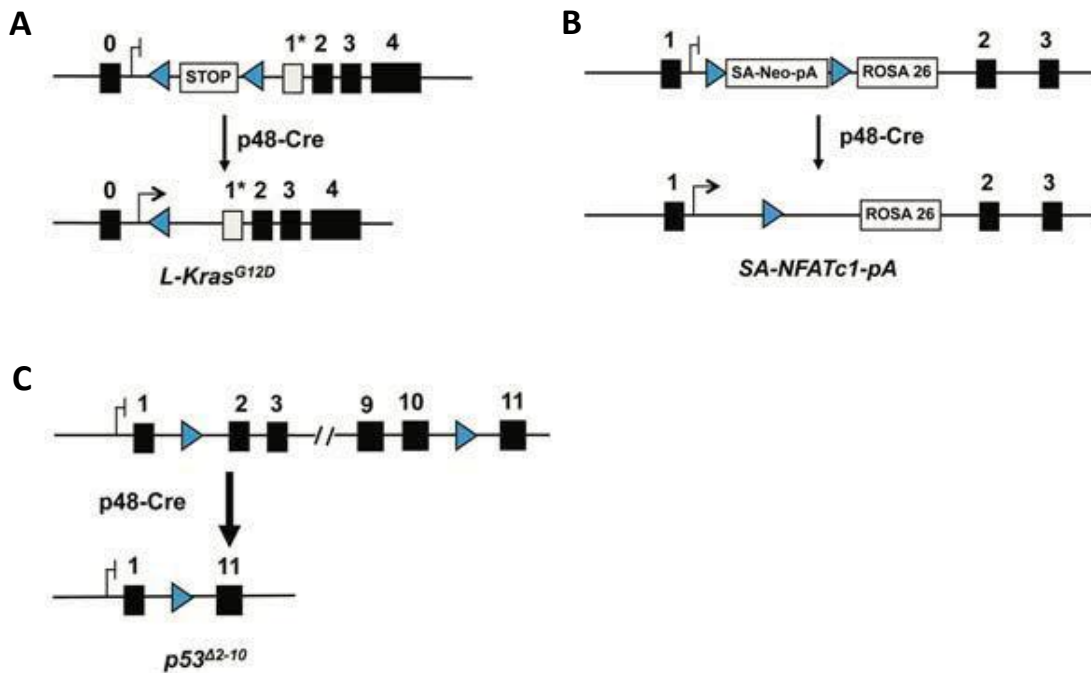


Abb. 11: Aktivierung der genetischen Veränderung *Kras^{G12D}* (A), *c.n.NFATc1* (B) und *p53^{Δ2-10}* (C) durch die pankreasspezifische p48-gekoppelte Cre-Rekombinase. (A) *Kras^{G12D}*: LSL-Konstrukt zwischen Transkriptionsstart und Exon 1 muss von p48-Cre-Rekombinase entfernt werden um Transkription zu gewährleisten. (B) *c.n.NFATc1*: LSL-Konstrukt in Intron 1 des *Rosa26*-Lokus muss durch p48-Cre-Rekombinase entfernt werden um Transkription von *NFATc1* und *Rosa26* zu ermöglichen. (C) *p53^{Δ2-10}*: p48-Cre-Rekombinase erkennt loxP-Erkennungssequenz zwischen Intron 1 und 2 sowie 10 und 11 und entfernt die Introns 2-10.

Ein Mausmodell mit einem *LSL-Kras^{G12D}*-Allel, welches durch die p48-Cre-Rekombinase aktiviert werden kann, wurde von Hingorani und Kollegen im Jahr 2003 eingehend untersucht und beschrieben. Hierbei ist das Lox-Stop-Lox (LSL)-Konstrukt zwischen dem Transkriptionsstart und Exon 1 des mutierten *Kras^{G12D}*-Gens lokalisiert, sodass die Transkription erst nach Entfernen des LSL-Konstruktes stattfinden kann. Die Mutation im Codon 12 von Exon 1 führt zu einem Austausch der Aminosäure Glycin durch Aspartat, was eine im menschlichen Pankreaskarzinom häufige onkogene Mutation darstellt (Hingorani *et al.* 2003). Der Mechanismus, durch welchen die Cre-Rekombinase zur Transkription des mutierten *Kras*-Allels führt ist in Abb. 11A dargestellt. Die pankreasspezifische konstitutive Aktivierung von *NFATc1* (*c.n.NFATc1* = *constitutively nuclear NFATc1*) wurde ebenfalls durch das Cre/loxP-System erreicht. Hierzu wurde das Genkonstrukt für *c.n.NFATc1* sowie ein Hämagglutinin (HA)-Marker in das erste Intron des Genlokus *Rosa26* eingebracht. Die Transkription konnte erst durch

Entfernen des LSL-Konstruktes durch die p48-gekoppelte Cre-Rekombinase stattfinden (Abb. 11B) Auch der pankreasspezifische *knock out* von p53 erfolgte mithilfe des Cre-loxP-Systems. Hierzu waren zwischen den Introns 1 und 2 sowie 10 und 11 loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase lokalisiert. In Anwesenheit der p48-gekoppelten Cre-Rekombinase werden die Exons 2 – 10 entfernt, was zu einem pankreasspezifischen *knock out* von p53 führt (Abb. 11C).

4.1.5 Gewinnen und Aufbereiten von Pankreastumorgewebe

Bei deutlichen Zeichen des Leidens der Maus durch den Tumor, wie aufgetriebenem Abdomen, struppigem Fell und verminderter Aktivität wurde das Tier mittels zervikaler Dislokation geopfert. Direkt im Anschluss wurde der Tumor im Situs präpariert, entnommen und mit PBS gewaschen. Nach Zerkleinern des Tumors wurde ein Teil in Kryoröhrchen zunächst in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei -80 °C konserviert. Ein weiterer Teil wurde über Nacht in Formaldehyd bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde dem Gewebe durch die folgende aufsteigende Alkoholreihe Wasser entzogen:

2 h	70 %	Ethanol
1 h	80 %	Ethanol
2 h	96 %	Ethanol
2 h	100 %	Ethanol

Anschließend wurde das Gewebe mit Methylbenzoat versetzt und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde das Gewebe für zwölf Minuten mit Xylol inkubiert, um anschließend in Paraffin überführt zu werden. Nach drei Waschschritten mit Paraffin im Abstand von ca. zwei Stunden wurde das Gewebe in dieses eingebettet.

4.2 Histologische Methoden

4.2.1 Fixieren von Pankreastumorgewebe auf Objektträgern

Die den Tumor enthaltenden Paraffinblöcke wurden vor dem Schneiden mit dem Mikrotom bei -20 °C gekühlt. Das Schneiden erfolgte mit einem Mikrotom von Leica, dessen Klinge und Auffangbecken permanent mit 70%igem Ethanol benetzt waren. Die erzeugten Schnittpräparate mit einer Dicke von 4 µm wurden bis zur Entfaltung des Gewebes im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die

Schnittpräparate auf Objektträgern fixiert und bis zum Trocknen in einem Trockenschrank inkubiert.

4.2.2 HE-Färbung

Zur histologischen Beurteilung der murinen Pankreastumore wurden die Schnittpräparate mittels Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung angefärbt. Um die Schnittpräparate zu rehydrieren, wurde zunächst eine absteigende Alkoholreihe aufgeführt, beginnend mit einer fünfminütigen Inkubation in Roticlear zum Entfernen des Paraffins, gefolgt von jeweils dreiminütiger Inkubation in 99%-, 96%-, 80%-, 70%-, 50%igem Ethanol. Anschließend wurden die Schnittpräparate für sieben Minuten in Hämalaun, einem basischen Farbstoff, welcher sämtliche sauren Bestandteile, allen voran den Zellkern blau anfärbt, inkubiert. Diese blaue Färbung wurde erst nach fünfminütigem Bläuen durch Spülen mit Wasser zum Erhöhen des pH-Wertes voll entfaltet. Im Anschluss an das Bläuen wurden die Gewebeschnitte für 30 Sekunden in Eosin, einem sauren Farbstoff, welcher die basischen Bestandteile und somit das Zytoplasma rot anfärbt, inkubiert. Anschließend wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt, um die gefärbten Schnitte wieder zu dehydrieren, wobei sie zuletzt dreimal für drei Minuten in Roticlear inkubiert und schließlich mithilfe von Rotimount eingedeckelt wurden.

4.2.3 Immunhistochemische Färbung

Um bestimmte Proteine der Gewebeschnitte anzufärben, wurden mithilfe spezifischer Antikörper immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dies erfolgte durch die ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode. Bei dieser Methode macht man sich die starke spezifische Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin zunutze. Die verwendeten Sekundärantikörper sind Biotin-gekoppelt, welches mit dem zugegebenen Streptavidin eine starke Bindung eingeht. An Streptavidin ist wiederum eine Peroxidase gekoppelt, welche durch Oxidation die Entstehung eines braunen Farbstoffs aus dem Substrat DAB katalysiert. Die ABC-Methode wurde mithilfe des Vectastain®ABC-Kits durchgeführt. Zunächst wurde, wie bei der HE-Färbung, eine absteigende Alkoholreihe, beginnend mit fünfminütiger Inkubation in Roticlear, durchgeführt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten in TE-Puffer gekocht. Nach 20minütigem

Abkühlen auf Eis und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten mit 3%iger H_2O_2 -Lösung zum Blockieren der endogenen Peroxidase inkubiert. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser und drei fünfminütigen Waschschritten mit PBST erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mit je 300 μl 10%iger BSA-Lösung pro Schnittpräparat für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die spezifischen Primärantikörper wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Verdünnungen der Antikörper sind in Kapitel 3.5 aufgelistet. Am nächsten Tag folgte nach drei fünfminütigen Waschschritten mit PBST zum Entfernen nicht gebundener Primärantikörper die Inkubation der biotinylierten Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschritten mit PBST zum Entfernen nicht gebundener Sekundärantikörper wurden die Schnittpräparate für 30 Minuten mit dem streptavidinhaltigen ABC-Komplex inkubiert. Wiederum nach drei fünfminütigen Waschschritten mit PBST erfolgte die Visualisierung mit dem Substrat DAB. Zur Gegenfärbung wurden die Gewebeschnitte für drei Minuten in Hämalun inkubiert, für fünf Minuten gebläut und anschließend einer aufsteigenden Alkoholreihe bis hin zu Roticlear unterzogen um sie schließlich mithilfe von Rotimount einzudeckeln.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Zellkultur

4.3.1.1 Kultivieren von Zellen

Die adhärent wachsenden murinen und humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurden in mit 20 ml Nährmedium befüllten Zellkulturflaschen kultiviert. Die Temperatur im Brutschrank betrug hierbei konstant 37 °C und der CO_2 -Gehalt 5 %. Das Nährmedium wurde alle zwei bis vier Tage gewechselt, indem das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und neues Medium hinzugefügt wurde.

4.3.1.2 Passagieren von Zellen

Nach lichtmikroskopischer Beurteilung, wurden die Zellen bei Erreichen der gewünschten Zelldichte in eine neue Zellkulturflasche überführt. Das verbrauchte Medium wurde hierfür abgesaugt, die Zellen mit ca. 10 ml PBS gewaschen und mit

5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für ca. fünf bis zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst vorlagen, wurde die Reaktion mithilfe von 10 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen überführt und für drei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand aus Nährmedium und Trypsinlösung wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit in unterschiedlicher Verdünnung in eine frische Zellkulturflasche überführt und kultiviert oder für Versuche verwendet.

4.3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Nach Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in je 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Zunächst wurden sie für 24 – 48 Stunden bei -80 °C gelagert, um sie später in flüssigem Stickstoff zu konservieren. Um konservierte Zellen wieder zur Verfügung zu stellen, wurden sie zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in eine mit 10 ml Nährmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt. Sobald die Zellen am Boden der Zellkulturflasche hafteten, wurde durch Wechseln des Mediums das Einfriermedium entfernt.

4.3.1.4 Bestimmen der Zellzahl

10 µl gründlich resuspendierter Zellen wurden in den Kapillarspalt einer Neubauer-Zählkammer überführt. Mithilfe des Lichtmikroskops wurde die Zellzahl in allen vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt und deren Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation des Ergebnisses mit 10.000 wurde der Zellgehalt in einem Milliliter bestimmt und je nach gewünschter Zellzahl die Verdünnung rechnerisch ermittelt.

4.3.1.5 Gewinnen von Zellen aus Tumorgewebe

Um Aussagen über die Regulationsmechanismen *in vitro* treffen zu können, wurden Tumorzellen aus murinem Pankreastumorgewebe isoliert. Hierzu wurde zunächst ein 2 – 3 mm großes Biopsat aus dem Tumor gewonnen und mithilfe eines Skalpells zerkleinert. Die zerkleinerte Gewebeprobe wurde für zehn Minuten in 10 ml Verdauungspuffer bei 37 °C inkubiert, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt,

das Pellet in Verdauungspuffer resuspendiert, für weitere zehn Minuten bei 37 °C inkubiert und wiederum für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Waschpuffer resuspendiert und die Zellsuspension durch ein 100 µm Zellsieb filtriert. Die Probe wurde für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, das Pellet in dem für murine Zelllinien verwendeten Medium (Kapitel 3.1) resuspendiert und in einer 10 cm Schale ausgesät. Am Folgetag sowie alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Medienwechsel sowie die lichtmikroskopische Kontrolle.

4.3.2 Behandeln von Zellen

Das Behandeln der Zellen mit 1 µM Cyclosporin A (CsA) oder 0,05 bzw. 0,1 µg/ml Gemcitabine erfolgte nach Wechseln des Mediums bei einer Konfluenz von 70 – 80 % für 24 Stunden.

4.3.3 Transfektion von Zellen

4.3.3.1 Transfektion mit siRNA

Für die Transfektion der Zellen mit gegen p53, NFATc1 oder Sox2 gerichteter siRNA (*small interfering RNA*) wurde das Transfektionsreagenz siLentFect verwendet. Die verwendeten Konstrukte sind in Kapitel 3.7 aufgelistet. 10 µl des gewünschten Konstrukts wurden mit 300 µl serum- und antibiotikafreiem Nährmedium inkubiert. Für die Kontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet. Gleichzeitig wurden pro Kondition 10 µl siLentFect mit 200 µl serum- und antibiotikafreiem Nährmedium inkubiert. Nach fünf Minuten wurden je 105 µl der siLentFect-Lösung zu Konstrukt- und Kontrolllösung gegeben und nach weiteren 20 Minuten Inkubationszeit auf die Zellen mit einer Konfluenz von 70 %, von welchen zuvor das Medium gewechselt wurde, überführt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen weiterverarbeitet.

4.3.3.2 Transfektion mit miRNA-Mimics und Antagomir

Die Transfektion der Zellen mit miRNA-Mimics und Antagomir erfolgte gleichermaßen mithilfe des Transfektionsreagenz „Lipofectamin“. Die verwendeten Konstrukte sind in Kapitel 3.7 aufgelistet. 6 µl des verwendeten Konstruktes wurden für fünf Minuten mit 250 µl serum- und antibiotikafreiem Medium inkubiert. Als Kontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet. Gleichzeitig wurden pro Kondition 12 µl Lipofectamin in 500 µl serum- und

antibiotikafreiem Medium inkubiert. Nach fünf Minuten wurden je 256 µl der Lipofectamin-Lösung zu *Mimics* bzw. *Antagomir* und Kontrolle gegeben und nach weiteren 20 Minuten Inkubationszeit auf die Zellen mit einer Konfluenz von 70 %, von welchen zuvor das Medium entfernt wurde, überführt. Nach sechsständiger Inkubation wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 18 Stunden wurden die Zellen weiterverarbeitet.

4.3.4 Sphere-Assay

Mithilfe des Sphere-Assays können Zellen mit Stammzeleigenschaften identifiziert werden. Die Zellen werden hierfür unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert. Zellen mit Stammzeleigenschaften können unter Ausbildung von Spheres überleben, während epitheliale Zellen sterben.

4.3.4.1 Aussähen der Zellen zur Sphere-Formation

Nach Bestimmung der Zellzahl und Verdünnung bis zum Erreichen der gewünschten Zellzahl wurden die Zellen zentrifugiert, mit Sphere-Medium gewaschen, erneut zentrifugiert und in Sphere-Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie in mit 10 ml Sphere-Medium befüllte Corning Platten überführt, wo sie bis zur weiteren Verwendung nicht-adhärenent wuchsen.

4.3.4.2 Wechsel des Mediums

Da die Zellen unter nicht-adhärenenten Bedingungen wachsen, ist beim Wechsel des Mediums im Rahmen des Sphere-Assays kein Trypsin zum Lösen der Zellen notwendig. Die Zellsuspension wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein 15 ml-Röhrchen überführt und für fünf Minuten zum Absetzen der Zellen ruhen gelassen. Das Medium wurde mit Ausnahme des untersten ml abgesaugt, welcher in die alte Corning Platte mit frischem Medium überführt wurde.

4.3.4.3 Behandlung mit Cyclosporin A

Um den Einfluss von Cyclosporin A auf die Sphere-Formation zu ermitteln, wurden die Zellen nach 24-stündiger Kultivierung in Corning Platten mit 1 µM CsA bzw. zur Kontrolle mit destilliertem Wasser behandelt. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut mit CsA behandelt, um nach weiteren 24 Stunden weiterverarbeitet zu werden.

4.3.4.4 Transfektion mit siRNA

Der Einfluss der transienten genetischen Depletion verschiedener Gene auf die Sphere-Formation wurde untersucht, indem die Zellen 24 Stunden nach Transfektionsbeginn in Corning Platten überführt und dort für weitere 48 Stunden kultiviert wurden. Die Transfektion mit siRNA erfolgte wie in 4.3.3.1 beschrieben.

4.3.4.5 Transfektion mit miRNA

Um den Einfluss der transienten Überexpression von miRNA auf die Sphere-Formation zu untersuchen, wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektionsbeginn in Corning Platten überführt und dort für weitere 48 Stunden kultiviert. Die Transfektion mit miRNA-*Mimics* erfolgte wie in 4.3.3.2 beschrieben.

4.3.4.6 Messen der Spheres

Das Messen der Spheres erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe des Programms Axio Vision Rel. 4.6. Hierzu wurde eine feste Anzahl zufällig ausgewählter Spheres entlang ihres größten Durchmessers vermessen.

4.3.4.7 Isolieren von RNA und Protein aus Spheres

Die Gewinnung von RNA und Protein erfolgte aus Spheres und adhärenenten Zellen gleichermaßen. (siehe Kapitel 4.4.2.1 und 4.4.3.1)

4.3.5 BrdU-Assay

Die Proliferationsrate von Zellen kann mithilfe des BrdU-Assays ermittelt werden. Hierbei wird der quantitative Einbau des Thymidin-Analogons Bromdesoxyuridin (BrdU) ermittelt. Bromdesoxyuridin kann während der S-Phase des Zellzyklus anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die DNA eingebaut werden. Der Einbau großer Mengen BrdU in die DNA weist daher auf eine starke Proliferation von Zellen hin. Die Menge an eingebautem BrdU kann mithilfe spezifischer Antikörper, welche mit einer Peroxidase gekoppelt sind, determiniert werden.

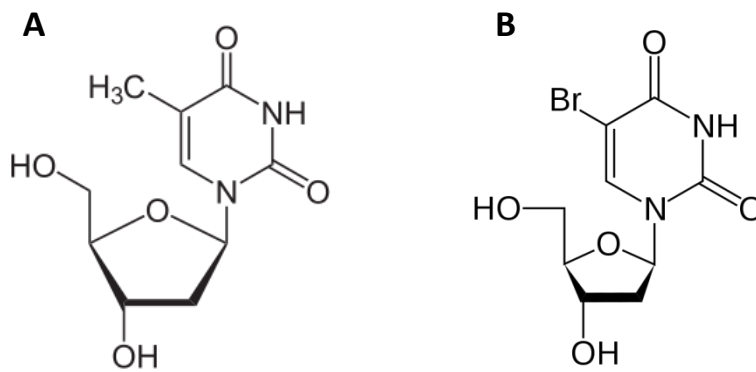


Abb. 12: Strukturformeln von (A) Desoxythymidin und (B) Bromdesoxyuridin

Je nach Wachstumseigenschaften der Zellen wurden 4000 oder 5000 Zellen pro Vertiefung einer Mikroplatte ausgesät, wobei die äußersten Vertiefungen mit PBS befüllt wurden, um ein Austrocknen der inneren zu vermeiden. Nach Behandlung der Zellen und 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 10 µl „BrdU labeling solution“ pro Vertiefung für vier (KNPC) bzw. acht Stunden (L3.6 und PDAC 10/11/11) markiert. Derselbe Ansatz wurde zehn Minuten vor Ende der Inkubationszeit als Kontrolle in eine weitere Vertiefung gegeben. Die Lösungen wurden abgesaugt und die Platte über Nacht im Kühlschrank getrocknet. Mithilfe des „Cell Proliferation ELISA, BrdU Kits“ wurde der Einbau von BrdU detektiert. Zunächst wurden in jede Vertiefung 200 µl „Fix Denate“ pipettiert, um die Zellen zu fixieren und die DNA zu denaturieren, damit diese zugänglicher für den Anti-BrdU-AK wurde. Nach 60 Minuten wurde die Substanz abgekippt und in jede Vertiefung 100 µl der „Anti-BrdU-POD working solution“, welche den Peroxidase-gekoppelten Antikörper enthielt, pipettiert, um weitere 120 Minuten zu inkubieren. Nach Abkippen dieser Lösung wurden die Vertiefungen dreimal mit je 200 µl der „Washing solution“ gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zuletzt wurden je 100 µl der „Substrat solution“, welche das Chromogen TMB (Tetramethylbenzidin) enthielt, in jede Vertiefung pipettiert und innerhalb von 10 Minuten die Lichtemission photometrisch mittels Luminometer Centro LB 960 gemessen. Für die Auswertung wurde der Extinktionswert der Kontrollreaktion vom Extinktionswert der für vier bzw. acht Stunden mit BrdU inkubierten Ansätze subtrahiert. Aus der Vierfachbestimmung wurde jeweils der Mittelwert berechnet.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Genotypisierung transgener Mäuse

4.4.1.1 Isolieren von DNA aus Schwanzgewebe

Zur Bestimmung des Genotyps während der Generierung transgener Mäuse wurde DNA aus dem Schwanz der Maus gewonnen. Das ca. 2 mm lange Präparat wurde mit 200 µl PBDN-Puffer und 3 µl Proteinase K versetzt, mit einem Reagenzglas-schüttler gemischt und bei 55 °C über Nacht inkubiert bis das Präparat gelöst vorlag. Nach Zentrifugieren wurden die Proben zur Inaktivierung der Proteinase K für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

4.4.1.2 Isolieren von DNA aus Pankreastumorgewebe

Zum Nachweis des korrekten Genotyps im Pankreastumor der Maus wurde die DNA mithilfe des „DNeasy Blood&Tissue Kits“ aus dem Tumorgewebe isoliert, wobei nach dessen Protokoll vorgegangen wurde. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte entsprechend der RNA-Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 4.4.3.3).

4.4.1.3 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Die genetischen Veränderungen der transgenen Mäuse wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Gelelektrophorese nachgewiesen. Hierzu wurde pro 2 µl der gelösten Mausschwanzbiopsie folgender Ansatz benötigt:

15,25 µl	H ₂ O
5 µl	GoTaq Puffer
1 µl	Primer <i>Forward</i>
1 µl	Primer <i>Reverse</i>
0,5 µl	dNTPs
0,25 µl	GoTaq DNA-Polymerase

Die verwendeten Primer sind in Kapitel 3.6.3 aufgelistet. Die Proben wurden gemeinsam mit dem Ansatz mit einem Reagenzglasschüttler gemischt und anschließend mit einem PCR-Cycler mithilfe des dem Primer entsprechenden Programms amplifiziert. In Tab. 3 sind die verwendeten Programme aufgelistet:

Tab. 3: Liste der verwendeten PCR-Programme zur Genotypisierung

Zielgen	PCR-Programm		
	Zyklusphase	Temperatur	Dauer
<i>c.n.NFATc1</i> <i>Rosa26</i>	Polymeraseaktivierung	95 °C	5 min
	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primerhybridisierung	60 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1 min
	Finale Elongation	72 °C	10 min
<i>Kras^{G12D}</i> <i>p53^{R172H}</i> <i>p48-Cre</i>	Polymeraseaktivierung	95 °C	2 min
	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primerhybridisierung	60 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1 min
	Finale Elongation	72 °C	5 min
<i>p53 flox</i> <i>p48-Cre-p53 flox</i>	Polymeraseaktivierung	95 °C	2 min
	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primerhybridisierung	58 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1 min
	Finale Elongation	72 °C	5 min

4.4.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das Amplifikat wurde anschließend zur erleichterten Auftragung mit Farbpuffer versetzt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und nachgewiesen. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 50 bzw. 100 ml TBE mit 0,5 bzw. 1,0 g Agarose aufgekocht und anschließend mit 0,8 bzw. 1,6 µl Ethidiumbromid versetzt und gemischt. Nach ca. 30 Minuten Polymerisationsvorgang bei Raumtemperatur konnte das Gel verwendet werden. Es wurden in jede Tasche 10 µl Probe pipettiert und zur Abschätzung der Länge der Amplifikate in ein bis zwei Geltaschen ein Marker gegeben. Je nach Länge des nachzuweisenden Amplifikats erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 120 V für 15 – 25 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die DNA-Banden im Gel auf einem UV-Leuchttisch visualisiert, da das mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid durch Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Durch Vergleich mit der Positivkontrolle konnte auf diese Weise für jede Probe das Vorhandensein der genetischen Veränderung evaluiert werden. Die Längen der einzelnen Amplifikate sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4: Länge der Amplifikate

Zielgen	Länge
<i>c.n.NFATc1</i>	295 bp
<i>Kras^{G12D}</i>	550 bp
<i>p53^{R172H}</i>	290 bp
<i>p53 Wildtyp</i>	288 bp
<i>p53 flox/flox (Int 10)</i>	370 bp
<i>p48-Cre-p53^{fl}</i>	612 bp
<i>p48-Cre</i>	600 bp

Während bei der *Kras^{G12D}*- und *p53^{R172H}*-Mutation sowie der *p48-Cre*-Rekombinase nicht zwischen Hetero- und Homozygotie unterschieden werden konnte, war dies bei *c.n.NFATc1* und *p53 flox* möglich. Im Fall von *c.n.NFATc1* wurde im Anschluss

an eine positive PCR auf *c.n.NFATc1* eine PCR zum Nachweis des Wildtyp-Allels von *Rosa26* durchgeführt. Das Vorliegen von *c.n.NFATc1* und *Rosa26* beweist eine Heterozygotie. Durch Verwendung der p53 flox-Primer wurde bei Vorliegen von Heterozygotie sowohl das Wildtyp-Allel als auch das den *knock out* enthaltende Allel amplifiziert, sodass in der Gelelektrophorese zwei Banden entstanden. Im Fall von p53 flox war es zudem möglich, die erfolgreiche Rekombination in der DNA des Pankreas nachzuweisen. Durch Verwendung der Primer *Int10 forward* und *Int1 reverse* entstand ein 612 bp langes Amplifikat, welches die erfolgreiche Rekombination bestätigte.

4.4.2 Proteinexpressionsanalysen

4.4.2.1 Isolieren von Protein aus Zellen

Um Aussagen über die Proteinexpression in Tumorzellen treffen zu können, mussten diese zunächst lysiert werden. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und anschließend in Abhängigkeit von der Größe der Platte 70 bis 150 µl Lysepuffer hinzugefügt. Mithilfe von Zellschabern wurden die Zellen vom Boden der Platte gelöst, in ein 1,5 ml-Eppendorf®-Reaktionsgefäß überführt und der Zellaufschluss durch Mischen mit einem Reagenzglasschüttler unterstützt. Vor der Proteinbestimmung oder Weiterverarbeitung der Proben wurden diese für 10 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert, um die Zellbestandteile zu trennen.

4.4.2.2 Isolieren von Protein aus Gewebe

Zur Isolierung von Protein aus murinem Pankreaskarzinomgewebe wurde zunächst auf Trockeneis eine mehrere Millimeter große Gewebeprobe mithilfe eines Skalpell zerkleinert. Diese Probe wurde mit folgendem Ansatz versetzt:

500 µl	Lysepuffer
20 µl	Complete
5 µl	PMSF

Mithilfe eines sterilen Mikropistills wurde die Gewebeprobe solange in Lysepuffer zerkleinert, bis es möglich war, die Suspension durch eine Spritzenkanüle auf- und abzuziehen. Anschließend wurde das Lysat in ein neues Eppendorf®-Reaktionsgefäß überführt und fortgefahren wie mit aus Zellen gewonnenem Gesamtzelllysat.

4.4.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit der photometrischen Methode nach Bradford. Durch Komplexbildung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blau-G-250 mit Proteinen wird dessen Absorptionsmaximum von 470 auf 595 nm verschoben, was photometrisch bestimmt werden kann. Zur Durchführung des Bradford-Assays wurden 200 µl der Proteinassay-Lösung in die Vertiefung einer 96-Well-Platte vorgelegt und 2 µl der Proben hinzugefügt. Zum Erhalt exakterer Ergebnisse erfolgte die Proteinbestimmung jeweils in Doppelbestimmung. Zum Erstellen einer Kalibrierungskurve wurden zudem 1, 2, 4 und 8 µl BSA mit der Konzentration 1 ng/µl, ebenfalls in Doppelbestimmung, eingesetzt. Anhand der photometrisch gemessenen Extinktionswerte konnte mithilfe der Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration der Proben rechnerisch ermittelt werden. Es wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen berechnet.

4.4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zum Gießen des Polyacrylamidgels wurden die Ansätze in der in Tab. 5 aufgeführten Zusammensetzung gemischt, wobei der Ansatz nach Zugabe des Polymerisationsinitiators APS und des Polymerisationskatalysators TEMED zügig gemischt und zwischen zwei Glasplatten pipettiert wurde. Nach ca. 60 Minuten Polymerisation bei Raumtemperatur konnte das Gel verwendet oder über Nacht bei 4 °C aufbewahrt werden.

Tab. 5: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels

Gel	Puffer	APS	TEMED
Sammelgel	1,75 ml Sammelgelpuffer	5,5 µl	5,5 µl
Trenngel	5 ml Trenngelpuffer	5,75 µl	5,75 µl
Stoppgel	0,5 ml Trenngelpuffer	4 µl	4 µl

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurden je 50 µl einer Probe mit 15 µl Laemmli versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend für eine Minute mittels Picofuge zentrifugiert. Um zu

gewährleisten, dass gleiche Mengen Protein jeder Probe eines Versuchs eingesetzt wurden, wurde je nach Konzentration der Probe das Volumen der aufgetragenen Probe angepasst. Je nach Verfügbarkeit der im Versuch verwendeten Proben, wurden zwischen 10 und 20 µg Protein aufgetragen. Um die Molekulargewichte der einzelnen Banden später zu identifizieren, wurden 6 µl des Proteinmarkers in eine oder mehrere Taschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in Gelelektrophoresekammern, welche mit Laufpuffer befüllt wurden. Nach einer anfänglichen Spannung von 120 V, welche bis zum Passieren des Sammelgels angelegt wurde, erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung von 160 V für ca. 90 Minuten bis zum Erreichen des Stoppgels.

4.4.2.5 Western Blot

Mittels Western Blot wurden die gelelektrophoretisch getrennten Proteine auf einer Nitrocellulosemembran fixiert und durch spezifische Antikörperreaktionen visualisiert. Für den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurden zunächst Sammel- und Stoppgel vom Trenngel entfernt, dieses vorsichtig von der Glasplatte entfernt und in Trans-Blot-Puffer überführt. Für den Elektroblot wurde der folgende Aufbau verwendet:

Kathode

Schwamm

Blotting-Papier, in Trans-Blot-Puffer getränkt

SDS-Polyacrylamid-Gel

Nitrocellulosemembran

Blotting-Papier, in Trans-Blot-Puffer getränkt

Schwamm

Anode

Der Elektroblot erfolge in einer mit Trans-Blot-Puffer gefüllten Trans-Blot-Kammer für 90 Minuten bei 400 mA und 4 °C. Um den Proteintransfer auf die Membran zu prüfen, wurde die Membran im Anschluss mit Ponceaurot gefärbt. Anschließend wurde die Membran in Abhängigkeit der Größe der zu untersuchenden Proteine zurechtgeschnitten und die Membran mit TBST gewaschen, bis keine rote Farbe mehr zu sehen war. Um unspezifische Bindungen

durch den Primärantikörper zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur mit 5%igem Milchpuffer geblockt. Anschließend erfolgte die Primärantikörperinkubation in entsprechender Verdünnung über Nacht auf einem Kippschüttler bei 4 °C. Die verwendeten Primärantikörper sind in Kapitel 3.5.2.1 aufgelistet. Am nächsten Tag folgten drei zehnminütige Waschschrte mit TBST um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Die Inkubation mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 5%igem Milchpuffer auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach 60 Minuten Inkubationsdauer erfolgten wiederum drei zehnminütige Waschschrte um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Für die ECL-Detektion der Proteinbanden wurde „ECL Oxidizing Reagent“ und „ECL Enhanced Luminol Reagent“ zu gleichen Teilen in einem Eppendorf®-Reaktionsgefäß gemischt. Nach Benetzen der Nitrocellulosemembran mit dem ECL-Gemisch wurde die Membran für eine Minute im Dunkeln inkubiert und anschließend zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Der Visualisierung der Proteinbanden liegt der folgende Mechanismus zugrunde: Das ECL-Gemisch enthält das Oxidationsmittel H_2O_2 und das Substrat Luminol, welches durch Oxidation mit der Emission von bläulichem Licht der Wellenlänge 425 nm reagiert. Das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym HRP (engl. Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase) katalysiert die Oxidation von Luminol durch das Oxidationsmittel H_2O_2 und die hierbei entstehende Chemolumineszenz kann detektiert werden. In dieser Arbeit erfolgte die Visualisierung der lumineszierenden Banden mithilfe der ChemoCam von Intas. Da für die Visualisierung der Banden einzelner Proteine eines Versuchs unterschiedliche Belichtungszeiten verwendet werden mussten, kann kein Vergleich der Expressionsniveaus unterschiedlicher Proteine erfolgen.

4.4.3 mRNA-Expressionsanalysen

4.4.3.1 Isolieren von RNA aus Zellen

Am Ende der jeweiligen Behandlungs- oder Transfektionsdauer wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, das PBS abgesaugt und der Zellaufschluss mit Lysis Buffer T durchgeführt. Mithilfe von sterilen Zellschabern wurden die Zellen vom Boden der Platte gelöst und in ein 1,5 ml-Eppendorf®-

Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Extraktion erfolgte mithilfe des „peqGOLD Total RNA Kit“, nach dessen Protokoll vorgegangen wurde.

4.4.3.2 Isolieren von RNA aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA aus murinem Pankreaskarzinomgewebe wurde zunächst auf Trockeneis ein mehrere Millimeter großes Stück abgeschnitten und mit sterilen Mörsern zu einem feinen Pulver verarbeitet. Dieses Pulver wurde für fünf Minuten mit QIAZOL® Lysis Reagent inkubiert. Nach Suspendieren des Pulvers durch Auf- und Abpipettieren wurden 150 µl Chloroform hinzugegeben und für 15 Sekunden mit einem Reagenzglasschüttler gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 Minuten bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die farblose Oberphase, welche die Nukleinsäuren enthielt, wurde abgenommen, mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt, mit einem Reagenzglasschüttler gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Proben für 20 Minuten bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Um das gesamte Ethanol von der Probe zu entfernen, ließ man das nach dem Absaugen verbliebene Ethanol auf Eis verdampfen. Die RNA wurde mit 55 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

4.4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mithilfe des NanoDrop®-ND-1000-Spektrometers bestimmt. Hierzu wurden 2 µl der Probe aufgetragen und die Absorption bei 260 nm gemessen, um die Nukleinsäurekonzentration der Probe zu berechnen. Zum Ausschluss einer Kontamination wurde zudem das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt, welches für RNA über 2,0 und für DNA über 1,8 liegen sollte.

4.4.3.4 Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNA in cDNA (komplementäre DNA) erfolgte mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Für die cDNA-Synthese aus RNA wurde das Omniscript® RT Kit verwendet, nach dessen

Protokoll vorgegangen wurde. Für 2 µg jeder Probe wurde folgender Ansatz benötigt:

2 µl Omniscript Buffer (10 x)

2 µl dNTP-Mix

0,4 µl Oligo dt-Primer

0,5 µl RNase-Inhibitor

1 µl Omniscript RT

Jeder Ansatz wurde mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur weiteren Verwendung wurde die entstandene cDNA anschließend mit Wasser 1 : 5 verdünnt.

4.4.3.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) dient der *in vitro*-Amplifikation von Nukleinsäuren und der Untersuchung des mRNA-Expressionsniveaus bestimmter Gene. Die Vervielfältigung der cDNA erfolgt durch sich wiederholende Zyklen von DNA-Denaturierungs-, Primer-hybridisierungs- und Amplifizierungsprozessen. Während des Amplifizierungsprozesses wird der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green an die amplifizierte DNA angelagert und die hierdurch entstehende Fluoreszenz detektiert. Je höher die cDNA-Konzentration des amplifizierten Gens, desto früher ist der Schwellenwert der Fluoreszenz erreicht.

Zur Durchführung der qPCR wurde für 2 µl jeder Probe in die Vertiefung einer 96-Well-Platte der folgende Ansatz vorgelegt:

10 µl SYBR Green

0,1 µl Primer *forward*

0,1 µl Primer *reverse*

7,8 µl H₂O

Die 96-Well-Platte wurde für eine Minute bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und in einem PCR-Cycler von Applied Biosystems mit dem folgenden Programm amplifiziert:

Enzymaktivierung:	95 °C	10 min	
Denaturierung:	95 °C	15 s	← 39 x
Primerhybridisierung:	60 °C	1 min	
Elongation:	95 °C	15 s	

Die Berechnung der relativen mRNA-Expression erfolgte mithilfe von C_T -Werten (*Cycle Threshold*): Diese C_T -Werte geben die Anzahl an Zyklen an, die nötig waren, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Zunächst wurde für jede Probe der C_T -Wert des Referenzgens *xs-13* vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (1).

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

Nach dieser Normierung wurde unter Berücksichtigung des exponentiell steigenden Fluoreszenzniveaus während der Amplifikation der Kehrwert des Quadrats von ΔC_T gebildet um die relative mRNA-Konzentration des untersuchten Gens zu erhalten (2).

$$\text{Konz. (mRNA)}_{\text{rel.}} = 1/(\Delta C_T)^2$$

Zuletzt wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmung jedes Gens berechnet.

4.4.4 MicroRNA-Expressionsanalysen

4.4.4.1 Isolieren von miRNA aus Zellen

Zur Bestimmung der Expression von miRNAs wurde die miRNA zunächst mithilfe des „miRNeasy Mini Kits“ isoliert, nach dessen Protokoll vorgegangen wurde. Die Bestimmung der miRNA-Konzentration erfolgte entsprechend der RNA-Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 4.4.3.3).

4.4.4.2 Reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA aus miRNA wurde zum Umschreiben von 10 ng miRNA der folgende Ansatz benötigt:

1,5 µl	10 x RT Buffer
0,15 µl	dNTP-Mix
3 µl	5 x TaqMan® Micro RNA Assay Primer
0,19 µl	RNase-Inhibitor
4,16 µl	Nuklease-freies Wasser
1 µl	Multiscribe™ RT Enzyme

Dieser Ansatz wurde zusammen mit 5 µl der miRNA mit der Konzentration 2 ng/µl für 65 Minuten in einem Cycler mit dem folgenden Programm inkubiert:

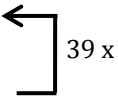
16 °C	30 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min

4.4.4.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion von miRNA

Die qPCR von miRNAs wurde mithilfe des TaqMan®Universal Master Mix II und dessen Protokoll durchgeführt. Für jeweils 4,8 µl der cDNA wurde der folgende Ansatz erstellt:

10 µl	TaqMan®Universal Master Mix II
1 µl	20 x TaqMan® Micro RNA Assay Primer
4,2 µl	RNase-freies Wasser

Die Ansätze wurden mit einem Reagenzglasschüttler gemischt, für eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert und in einer PCR-Maschine von Applied Biosystems mit dem folgenden Programm amplifiziert:

UNG-Enzymaktivierung:	50 °C	2 min	
Polymeraseaktivierung:	95 °C	10 min	
Denaturierung:	95 °C	15 s	
Annealing/Elongierung:	60 °C	1 min	

Die Berechnung der relativen miRNA-Expression anhand der C_T -Werte erfolgte entsprechend der Berechnung der relativen mRNA-Expression (siehe Kapitel 4.4.3.5). Als Referenz wurde die hochkonservierte snRNA U6 verwendet.

4.4.5 Chromatinimmunpräzipitation

Die spezifische Bindung eines Proteins an einen bestimmten DNA-Abschnitt und dessen Relevanz für die Transkription des betroffenen Gens lässt sich durch die Chromatinimmunpräzipitation untersuchen. Hierzu werden vorhandene Protein-DNA-Bindungen durch Formaldehyd fixiert und die Zellen mit verschiedenen Lysepuffern lysiert, um das Chromatin mit gebundenen Proteinen zu erhalten. Das Chromatin wird durch Sonifizieren fragmentiert und im Anschluss wird eine Immunpräzipitation durchgeführt, wobei spezifische Antikörper gegen Proteine verwendet werden, deren Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen man untersuchen möchte. Nach mehreren Waschschritten enthalten die Proben nur noch das zu untersuchende Protein und dessen gebundene DNA-Abschnitte. Durch anschließendes Lösen der Quervernetzung und Aufreinigung der DNA erhält man jene DNA-Abschnitte, die durch das untersuchte Protein gebunden waren. Durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion kann nun untersucht werden, ob und wie stark die Proteine an bestimmte DNA-Abschnitte binden.

4.4.5.1 Isolieren des Chromatins

Die Zellen wurden in fünf 20 cm-Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Zunächst erfolgte die Fixierung der Protein-DNA-Bindungen durch Zugabe von 274 μ l 37%iger Formaldehydlösung pro 10 ml Medium. Nach zehnminütiger Inkubationszeit, während derer die Platten bei Raumtemperatur geschwenkt wurden, wurde die Quervernetzung durch fünfminütige Inkubation mit 550 μ l 2,5 M Glycin pro Kulturschale gestoppt. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit eisgekühltem PBS wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers in PBS aufgenommen und der Inhalt aller Schalen gemeinsam in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Probe wurde bei 2500 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der dabei entstandene Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml Lysepuffer I resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe wiederum bei 2500 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Das Pellet wurde

in 5 ml RIPA-Puffer resuspendiert, auf fünf 15 ml-Röhrchen verteilt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mithilfe des Sonifier W 250-D wurden die Proben in einem Eisbad bei einer Amplitude von 20 % und einer Pulszahl von 120 sonifiziert, um das Chromatin zu fragmentieren. Nach dem Sonifizierungsprozess wurden die Proben wieder in ein 15 ml-Röhrchen zusammengeführt und bei 4 °C aufbewahrt.

4.4.5.2 Überprüfen der Sonifizierungseffizienz

Um zu prüfen, ob das Sonifizieren zu DNA-Fragmenten der gewünschten Größe geführt hat, wurde ein Teil der Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden 50 µl der Probe entnommen, mit 1 µl Proteinase K sowie 0,7 µl RNase A versetzt und zunächst für drei Stunden bei 55 °C und im Anschluss über Nacht bei 65 °C inkubiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 10 µl der Probe entsprechend des Protokolls in Kapitel 4.4.1.4 Die gewünschte Länge des Chromatins lag zwischen 200 und 1000 bp. Wurde eine Länge von 1000 bp nicht überschritten, dann konnte ohne weitere Sonifizierungsschritte mit der Immunpräzipitation fortgefahren werden. Die übrigen 40 µl wurden mithilfe des PCR Purification Kits von Qiagen aufgereinigt und die DNA-Konzentration mittels Nanodrop (siehe Kapitel 4.4.3.3) bestimmt.

4.4.5.3 Blockieren der Sepharose beads

Pro IP wurden 110 µl Agarose A- oder G-beads benötigt. Diese wurden zum Blockieren zunächst zweimal in RIPA-Puffer gewaschen, anschließend mit 586 µl BSA (10 mg/ml), 438 µl *Salmon Sperm*-DNA (400 µg/ml) und 400 µl Complete (25 x) versetzt und mit RIPA-Puffer auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Zum Blockieren der Agarose-beads wurde dieser Ansatz über Nacht bei 4 °C rotiert.

4.4.5.4 Preclearing und Immunpräzipitation

Bevor durch das *Preclearing* unspezifische Bindungen entfernt wurden, wurde die Probe für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Die über Nacht geblockten *beads* wurden für fünf Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert und mit dem equivalenten Volumen RIPA-Puffer verdünnt. Pro IP wurden 30 µl dieser Suspension mit 1 µg Maus- und Kaninchen-IgG versetzt, mit RIPA-Puffer auf 1 ml aufgefüllt und für zwei Stunden bei 4 °C rotiert. Anschließend wurde die Suspension zur Probe gegeben und diese für

weitere zwei Stunden bei 4 °C rotiert. Die Probe wurde bei 5000 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und pro IP wurden 100 µg des Überstandes, welcher das vorgereinigte Chromatin enthielt, in 1,5 ml-Eppendorf®-Reaktionsgefäße überführt. Diese Proben wurden mit 4 µg Antikörper in der entsprechenden Verdünnung über Nacht bei 4 °C rotiert. Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 3.5.3 aufgelistet. Der Rest der sonifizierten Probe wurde bei 4 °C aufbewahrt und weiter zur Inputkontrolle verwendet. Am Folgetag wurden die restlichen geblockten *beads* mit RIPA-Puffer 1 : 1 verdünnt und jeder IP 50 µl dieser Suspension hinzugefügt. Diese Ansätze wurden für zwei Stunden bei 4 °C rotiert.

4.4.5.5 Waschschritte

Die Proben wurden bei 5000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand mithilfe einer Spritze und mit einer feinen Kanüle aspiriert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschritte mit den folgenden Waschpuffern: Waschpuffer I (1 x), Waschpuffer II (1 x), Waschpuffer III (2 x), TE-Puffer (2 x). Hierfür wurde je 1 ml der Puffer vorsichtig auf die Pellets gegeben, durch Schwenken gemischt und für eine Minute bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschritt wurde durch Stoßen der Kanüle in die Pellets sämtlicher Waschpuffer entfernt.

4.4.5.6 Aufreinigung der DNA

Zu den Pellets wurden 100 µl TE-Puffer und 0,5 µl RNase gegeben. Zudem wurden zur Herstellung des Inputs 10 µg von der überbliebenen sonifizierten Probe mit 0,5 µl RNase A versetzt. Proben sowie Input wurden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 2,5 µl 20 % SDS und 2,5 µl Proteinase K (20 ng/ml) versetzt. Zur Spaltung der Proteine wurden die Ansätze für 4 Stunden bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 65 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der DNA erfolgte mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit, nach dessen Protokoll vorgegangen wurde.

4.4.5.7 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Um bestimmte DNA-Abschnitte nachzuweisen, an welchen die untersuchten Proteine gebunden waren, wurde im Anschluss mit der aufgereinigten DNA eine

qPCR durchgeführt. Die PCR erfolgte entsprechend dem Protokoll in Kapitel 4.4.3.5 „Quantitative Polymerase-Kettenreaktion“, wobei anstatt 2 µl nur 1 µl der Probe eingesetzt wurde. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 3.6.2 aufgelistet. Für die Auswertung wurden anstelle eines Referenzgens die Input-Werte von den Werten der IP-Proben subtrahiert.

4.5 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Säulendiagramme stellen Mittelwerte (Säulen) und die entsprechenden Standardabweichungen (Fehlerbalken) dar. Wurde die Dreifachbestimmung einer Einzelprobe durchgeführt, so stellt die Standardabweichung die Pipettiergenauigkeit an. Bei $n > 1$ gibt die Standardabweichung die Abweichung der Einzelwerte der einzelnen Proben vom Mittelwert an. Nur bei $n > 1$ wurden die p-Werte mit Excel berechnet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ als signifikant (*), $p < 0,01$ als hoch signifikant (**) und $p < 0,005$ als höchst signifikant (***) festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Mausmodells KNP^{+/-}C

Im transgenen Mausmodell wurde von der AG Ellenrieder bereits demonstriert, dass die Kombination aus onkogener *Kras*^{G12D}-Mutation, konstitutiv aktivem NFATc1 (*c.n.NFATc1*) und *p53*^{R172H}-Mutation zu einer stark akzelerierten Karzinogenese mit entdifferenziertem Phänotyp führt. Daraufhin wurde ein weiteres Mausmodell generiert: die KNP^{+/-}C-Maus. Bei diesem Mausmodell wurde die Tumorsuppressorfunktion von p53 nicht durch Mutation, sondern durch den genetischen Verlust inaktiviert. Anhand dieser beiden Mausmodelle wurde untersucht, ob und inwiefern die Aktivierung von NFATc1 sowie die Inaktivierung der Tumorsuppressorfunktion von p53 – sowohl durch Mutation als auch durch genetischen Verlust – zu einem entdifferenzierten Phänotyp des Pankreaskarzinoms beitragen. Da die KNPC-Mutante bereits in Vorarbeiten der AG Ellenrieder charakterisiert wurde, ist hier zunächst die Charakterisierung der KNP^{+/-}C-Maus mit genetischem Verlust von p53 dargestellt. Die Mäuse dieses Genotyps wurden der Mendel'schen Verteilung entsprechend geboren und zeigten bei Geburt einen gesunden Phänotyp. Innerhalb von sechs bis acht Wochen entwickelten sie eine ausgeprägte Kachexie sowie eine tumor- und aszitesbedingte Vorwölbung des Abdomens. In Abb. 13B sind beispielhaft Tumore dargestellt, welche bis zu 3 cm groß waren. Zudem ist in Abb. 13A die erfolgreiche Genotypisierung aller vier Gene sowohl in Mausschwanzbiopsaten, als auch im Pankreaskarzinom dargestellt. Während die Rekombination keinen Einfluss auf die Länge der Amplifikate der Gene *Kras*^{G12D} und *c.n.NFATc1* hatte, konnte im Falle des *p53-knockouts* die erfolgreiche Rekombination durch p48-Cre in Pankreasgewebe nachgewiesen werden.

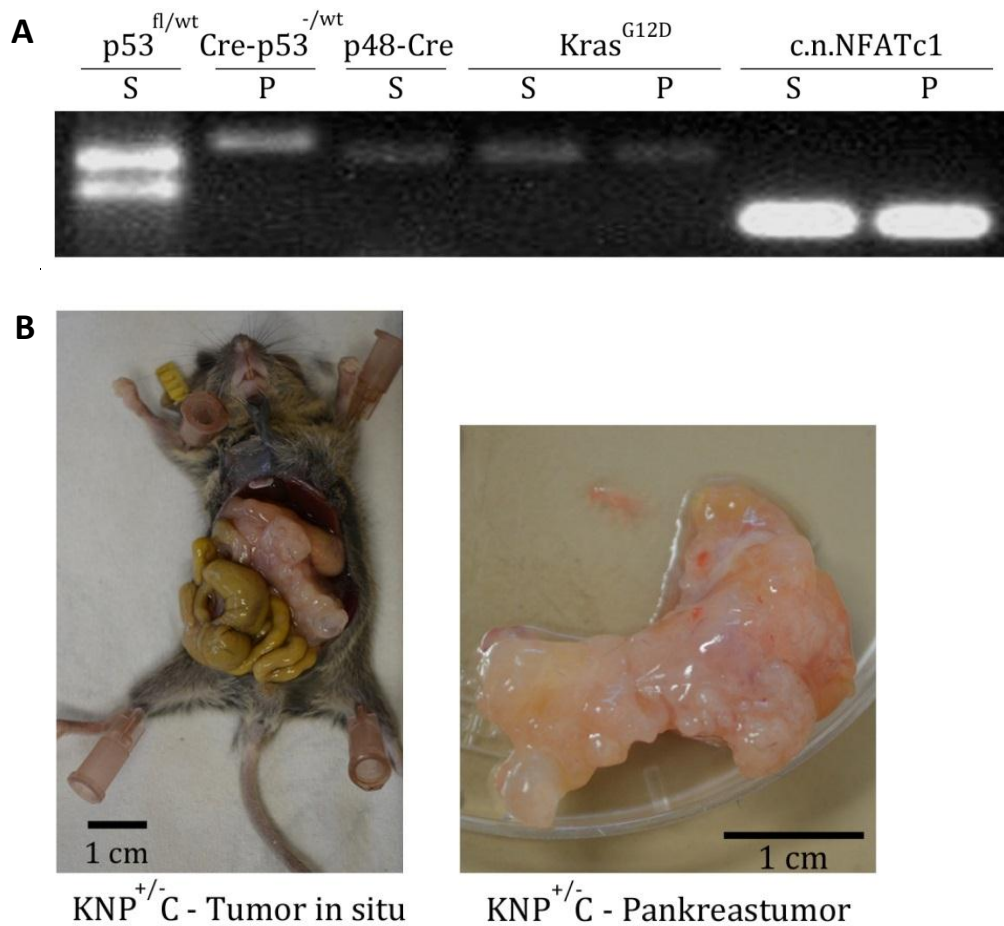


Abb. 13: Charakterisierung der KNP^{+/-}C-Maus. Es wurden transgene Mäuse mit den Genen $Kras^{G12D}$, $c.n.NFATc1$, $p53^{fl/wt}$ und $p48-Cre$ (KNP^{+/-}C) kreiert. In Abbildung (A) ist die Genotypisierung dieser KNP^{+/-}C-Maus dargestellt. Hierzu wurde DNA aus dem Schwanz (S) bzw. Pankreas (P) gewonnen, mittels PCR wurden die Gene $p53^{fl/wt}$, $p48-Cre-p53^{fl}$, $p48-Cre$, $Kras^{G12D}$ und $c.n.NFATc1$ amplifiziert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Abbildung (B) zeigt beispielhaft den Pankreastumor einer KNP^{+/-}C-Maus *in situ* und in Nahaufnahme.

Durch immunhistochemische Analysen wurde eine starke nukleäre Expression von HA in anaplastischen Arealen nachgewiesen, welches gemeinsam mit dem mutierten $NFATc1$ -Gen in das Genom integriert wurde und somit stellvertretend für die Expression von $NFATc1$ nachgewiesen wird. Die Expression von $p53$ sowie die Expression des epithelialen Markers Cytokeratin 19 (CK-19) waren in anaplastischen Arealen nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 14).

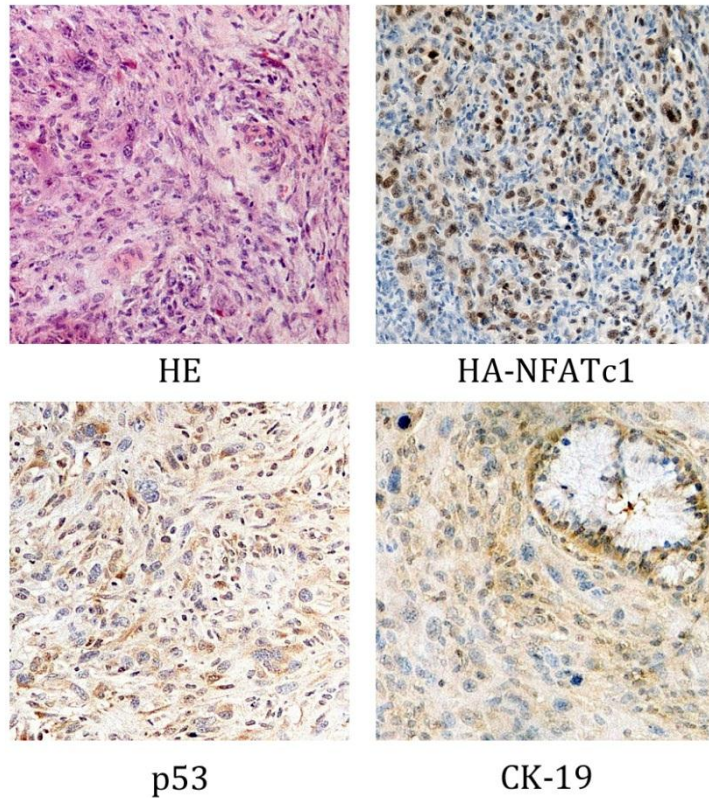
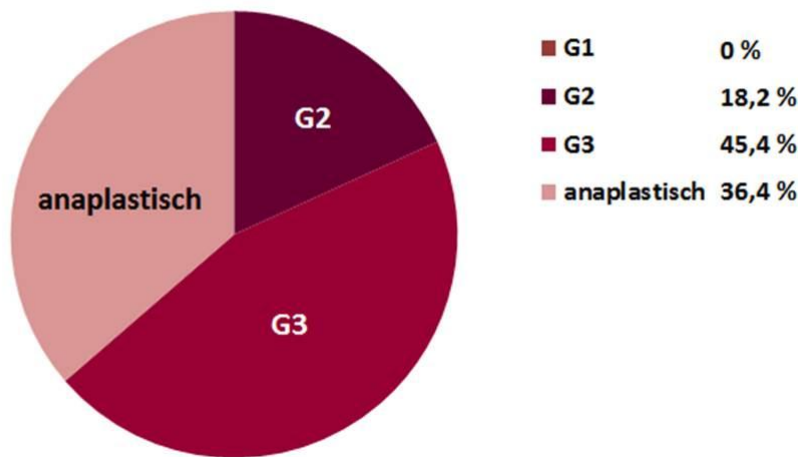


Abb. 14: Immunhistochemische Analyse der Expression von HA-NFATc1, p53 und CK-19 in KNP^{+/-}C-Tumoren. Murine Pankreasschnitte wurden mit HE gefärbt, bzw. mit HA-, p53- und CK-19-Antikörpern inkubiert und mit DAB visualisiert. Gezeigt sind Ausschnitte in 20-facher Vergrößerung.

Die Tumore zeigten einen stark entdifferenzierten Phänotyp. Über 80 % der Tumore waren anaplastische oder G3-Tumore. 18,2 % der Tumore wurden als G2-Tumore eingestuft, während gut differenzierte G1-Tumore nicht zu finden waren. In Abb. 15 sind die überwiegenden Differenzierungsgrade der KNP^{+/-}C-Maus dargestellt.

A



B

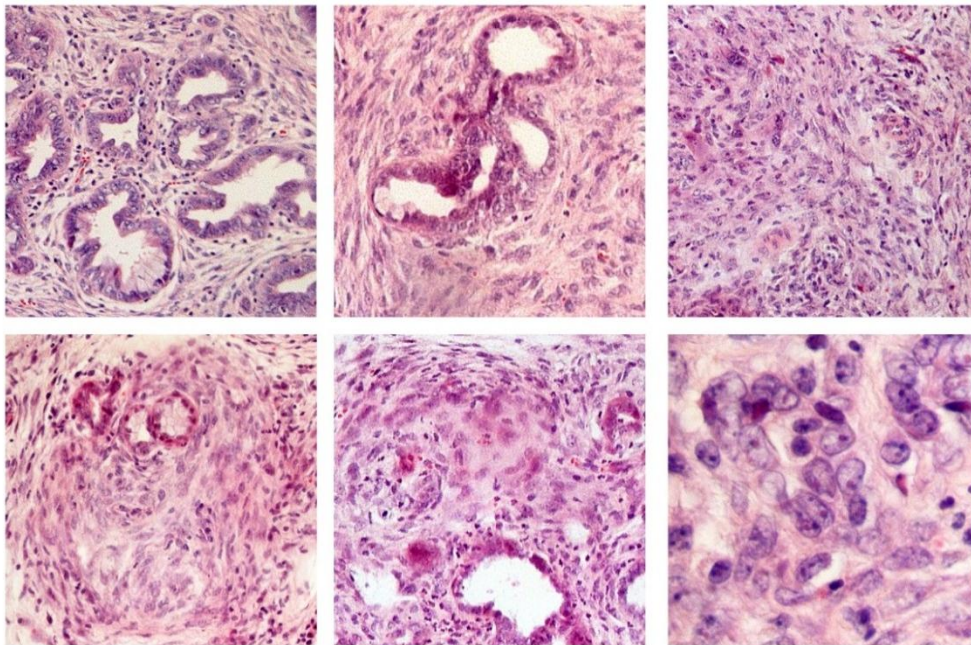


Abb. 15: Histologie und Grading von KNP^{+/-}C-Tumoren. **(A)** Prozentuale Verteilung des Differenzierungsgrades nach WHO von 11 KNP^{+/-}C-Pankreastumoren. Angegeben ist der Differenzierungsgrad, der den flächenmäßig größten Anteil des Tumors einnimmt. **(B)** Darstellung der verschiedenen Differenzierungsgrade von KNP^{+/-}C-Pankreastumoren in HE-Färbung. Gezeigt sind Ausschnitte in 20- sowie 40-facher Vergrößerung.

5.2 Der Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 führt zu einer gesteigerten Expression von Stammzellfaktoren

Wie in vorangehenden Versuchen der AG Ellenrieder gezeigt werden konnte, führt der endogene Verlust des Tumorsuppressors p53 in transgenen Mäusen mit *Kras*^{G12D}-Mutation und konstitutiver Aktivierung von NFATc1 (NKC-Mäuse) zu einem entdifferenzierten Phänotyp. Um festzustellen, ob dieser Effekt durch

Stammzellfaktoren vermittelt wird, wurden molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Gewebe, das aus NKC-Pankreastumoren mit endogenem Verlust von p53 gewonnen wurde, trägt im Folgenden die Bezeichnung „NKC p53 Verlust“, während Gewebe aus NKC-Pankreastumoren mit normaler p53 Expression als „NKC p53 Wildtyp“ bezeichnet wird. Durch Western Blot wurde eine erhöhte Proteinexpression von Sox2 und Oct4 in NKC-Tumoren mit Verlust von p53 nachgewiesen, während für Klf4 keine eindeutige Tendenz zu erkennen war (Abb. 16A). Diese Beobachtung wurde für Sox2 und Oct4 auf mRNA-Ebene bestätigt (Abb. 16B).

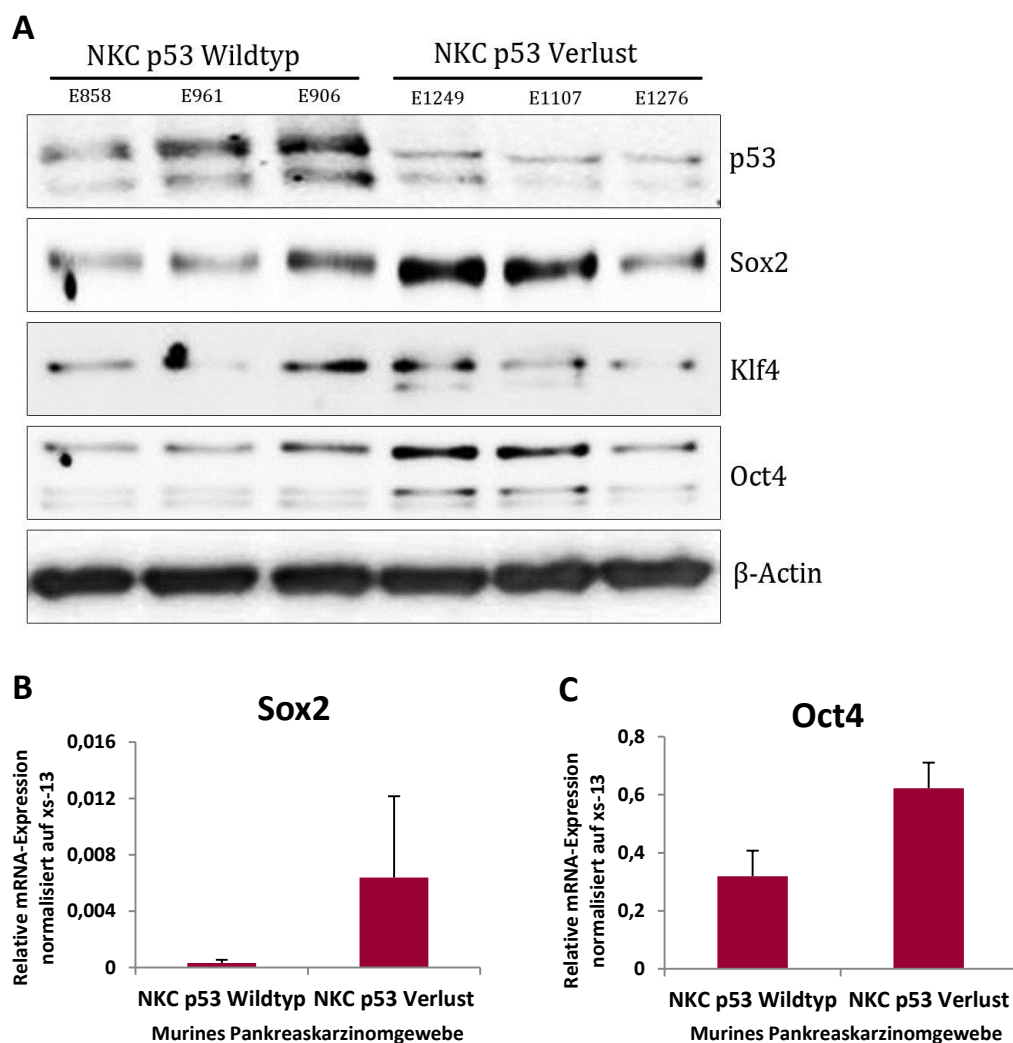


Abb. 16: Expressionsverhalten von p53, Sox2, Klf4 und Oct4 in murinem Pankreaskarzinomgewebe. (A) Aus murinem Pankreaskarzinomgewebe von NKC-Mäusen mit p53 Wildtyp [E858, E961, E906] und von solchen mit p53 Verlust [E1249, E1107, E1276] wurde Protein gewonnen und dieses durch Western Blot auf die Expression von p53, Sox2, Klf4 und Oct4 untersucht. β-Actin diente als Ladekontrolle. Zudem wurde die RNA von zwei (B) bzw. einer (C) Maus mittels RT-qPCR auf Sox2 und Oct4 analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der auf das Referenzgen xs-13 bezogenen mRNA-Expression der beiden Gruppen ± SD.

Der Vergleich der mRNA-Expression von Sox2 und Klf4 in NKC p53 Wildtyp-Pankreastumoren mit der in KNP^{+/-}C-Pankreastumoren zeigte zudem eine erhöhte Expression beider Stammzellfaktoren in Pankreaskarzinomen mit genetischem Verlust von p53, wobei die Expressionsunterschiede statistisch nicht signifikant waren ($p > 0,05$) (Abb. 17).

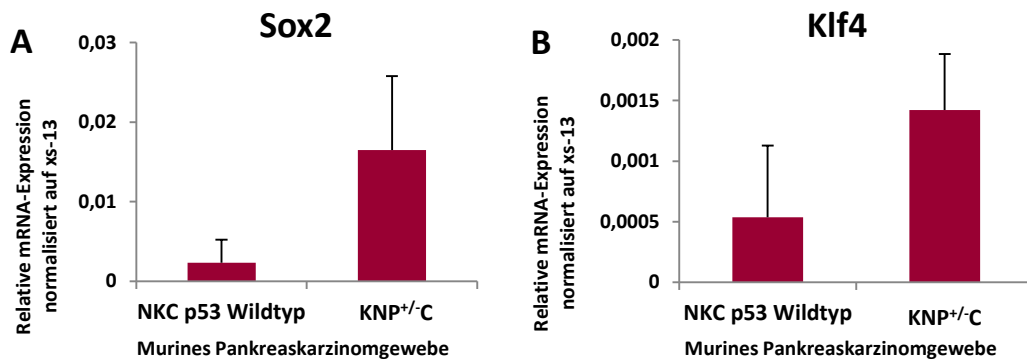


Abb. 17: Expressionsverhalten von Sox2 und Klf4 in murinem Pankreaskarzinomgewebe unterschiedlichen Genotyps. Aus murinem Pankreaskarzinomgewebe von NKC Mäusen mit p53 Wildtyp (A) [E961, E1141] (B) [E961, E858, E1141] und KNP^{+/-}C-Mäusen mit heterozygotem p53-*knockdown* [E1678, E1679, E1681] wurde RNA isoliert und mittels RT-qPCR Sox2 und Klf4 amplifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der auf das Referenzgen xs-13 bezogenen mRNA-Expression der beiden Gruppen \pm SD.

Um festzustellen, wie p53 die Entdifferenzierung des Pankreaskarzinoms unterdrückt, wurde ermittelt, welche Gengruppen nach Verlust von p53 in NKC-Tumorzellen verstärkt exprimiert werden. Die hierfür verwendete Zelllinie NKC II wurde aus NKC-Tumorgewebe mit p53 Wildtyp gewonnen. Nach genetischer Depletion von p53 in NKC II Zellen wurde ein DNA-Microarray durchgeführt. Die Ergebnisse des Microarrays wurden statistisch mittels GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) analysiert. In Abb. 18 sind die Gengruppen aufgelistet, welche einen positiven NES (*Normalized Enrichment Score*) aufweisen und gleichzeitig mit Stammzeleigenschaften assoziiert sind. Die stammzellosoziierte Gengruppe, deren Expression nach genetischer Depletion von p53 am stärksten anstieg, war die Gruppe *WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE*, welche von Wong und Kollegen im Jahr 2008 beschrieben wurde (Wong *et al.* 2008). Weitere stammzellosoziierte Gengruppen waren *BHATTACHARYA_EMBRYONIC_STEM_CELL*, *DOUGLAS_BMI1-TARGETS_UP* und *CONRAD_STEM_CELL*, welche die Autoren in unterschiedlichen Zelllinien und Tumorarten etablierten (Bhattacharya *et al.* 2004; Douglas *et al.* 2008; Conrad *et al.* 2008).

Datenbank	NES	FDR
WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE	2.06	002
BHATTACHARYA_EMBRYONIC_STEM_CELL	1.85	018
DOUGLAS_BMI1_TARGETS_UP	1.78	033
CONRAD_STEM_CELL	1.60	112

Abb. 18: GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS auf Basis eines DNA-Microarrays. NKC II Zellen wurden mit gegen p53 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect™* behandelt. Die nach 24 Stunden gewonnene RNA wurde in cDNA umgewandelt. Mit diesen Proben wurde durch Lukas Rycak vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg ein DNA-Microarray durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse wurden statistisch mittels GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) ausgewertet. Dargestellt sind nur solche Gendatenbanken, die mit Stammzeleigenschaften assoziiert sind und die nach dem *knockdown* von p53 einen positiven „Normalized Enrichment Score“ (NES) zeigten, die also hochreguliert wurden. Die FDR (*False discovery rate*) gibt die falsch positive Rate an.

Um einzelne Stammzellfaktoren zu identifizieren, deren Expression nach genetischer Depletion von p53 in NKC II Zellen ansteigt, wurde eine *Heatmap* aus den Ergebnissen des DNA-Microarrays erstellt. Diese ist in Abb. 19 dargestellt und zeigt einen Anstieg der Stammzellfaktoren Sox2 und Klf4 nach genetischer Depletion von p53.



Abb. 19: Heatmap, die die Auswirkung der genetischen Depletion von p53 auf die Expression bestimmter Stammzellregulatoren in NKC II Zellen demonstriert. NKC II Zellen wurden mit gegen p53 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect™* behandelt. Die nach 24 Stunden gewonnene RNA wurde in cDNA umgewandelt. Diese Proben wurden zur Durchführung eines DNA-Microarray an Lukas Rycak vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg gesandt. Das Ergebnis zeigt eine verstärkte Expression der Stammzellfaktoren Sox2 und Klf4 nach genetischer Depletion von p53.

Um die Ergebnisse von GSEA und DNA-Microarray zu bestätigen, wurde die Expression dieser und weiterer Stammzellfaktoren nach genetischer Depletion von p53 bestimmt. Hierbei resultierte der transiente *knockdown* von p53 in einer

Zunahme der mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Oct4 und Bmi1 (Abb. 20) sowie einer Zunahme der Proteinexpression von Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog (Abb. 21).

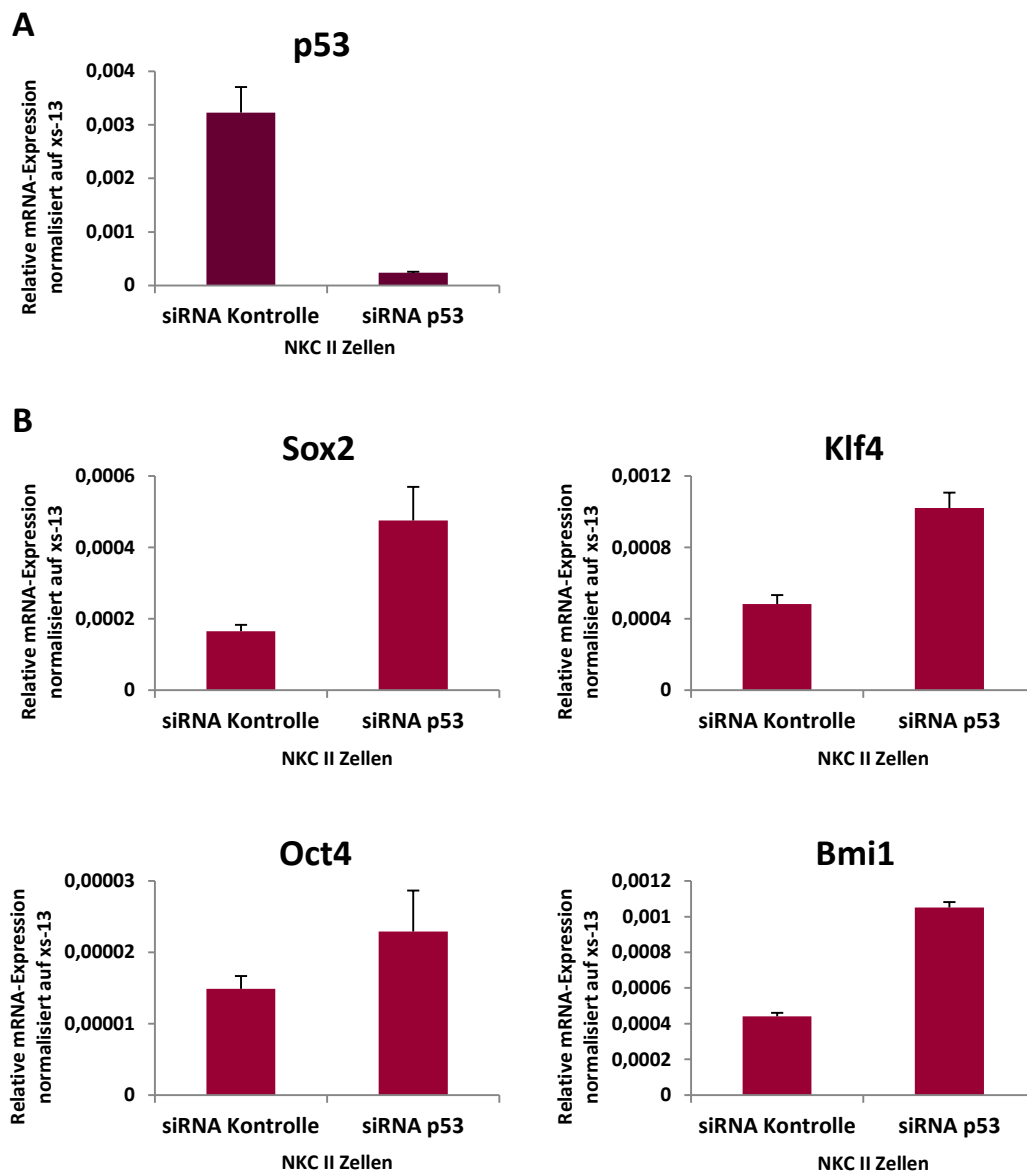


Abb. 20: Einfluss der genetischen Depletion von p53 auf die mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Oct4 und Bmi1 in NKC II Zellen. Darstellung der durch RT-qPCR ermittelten mRNA-Expression von p53, Sox2, Klf4, Oct4 und Bmi1 in NKC II Zellen nach 24-stündiger Transfektion mit gegen p53 gerichteter siRNA bzw. alleiniger Behandlung mit *siLentFect*TM als Kontrolle. Abbildung **(A)** stellt die Kontrolle des *knockdowns* von p53 dar und Abbildung **(B)** die relative mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Oct4 und Bmi1. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD.

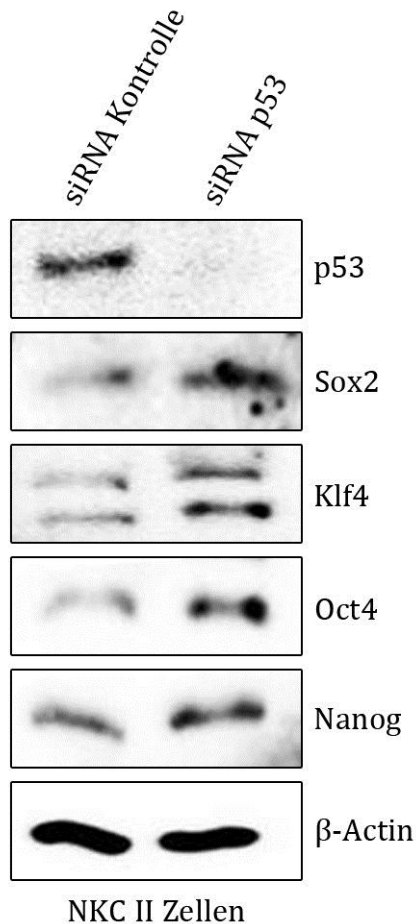


Abb. 21: Einfluss der genetischen Depletion von p53 auf die Proteinexpression von Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 in NKC II Zellen. NKC II Zellen wurden mit gegen p53 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect™* behandelt. Nach 24 Stunden wurde Gesamtzelllysat gewonnen. Durch Western Blot konnte der *knockdown* von p53 kontrolliert sowie die Proteinexpression von Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog untersucht werden. β-Actin diente als Ladekontrolle.

Zu den Stammzeleigenschaften gehört, neben der Pluripotenz und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Fähigkeit unter nicht-adhärennten Bedingungen sogenannte Spheres zu bilden (Dontu *et al.* 2003; Hermann *et al.* 2007). Man geht davon aus, dass epitheliale Zellen zugrunde gehen, während nur Zellen überleben, die Stammzeleigenschaften besitzen. Hierbei korreliert die Größe und Anzahl der gebildeten Spheres mit dem Ausmaß der Stammzeleigenschaften der Zellen (Dontu *et al.* 2003). Nach genetischer Depletion von p53 in NKC II Zellen konnte eine gesteigerte Sphere-Bildung sowie eine leichte Zunahme der Expression von Sox2 nachgewiesen werden (Abb. 22).

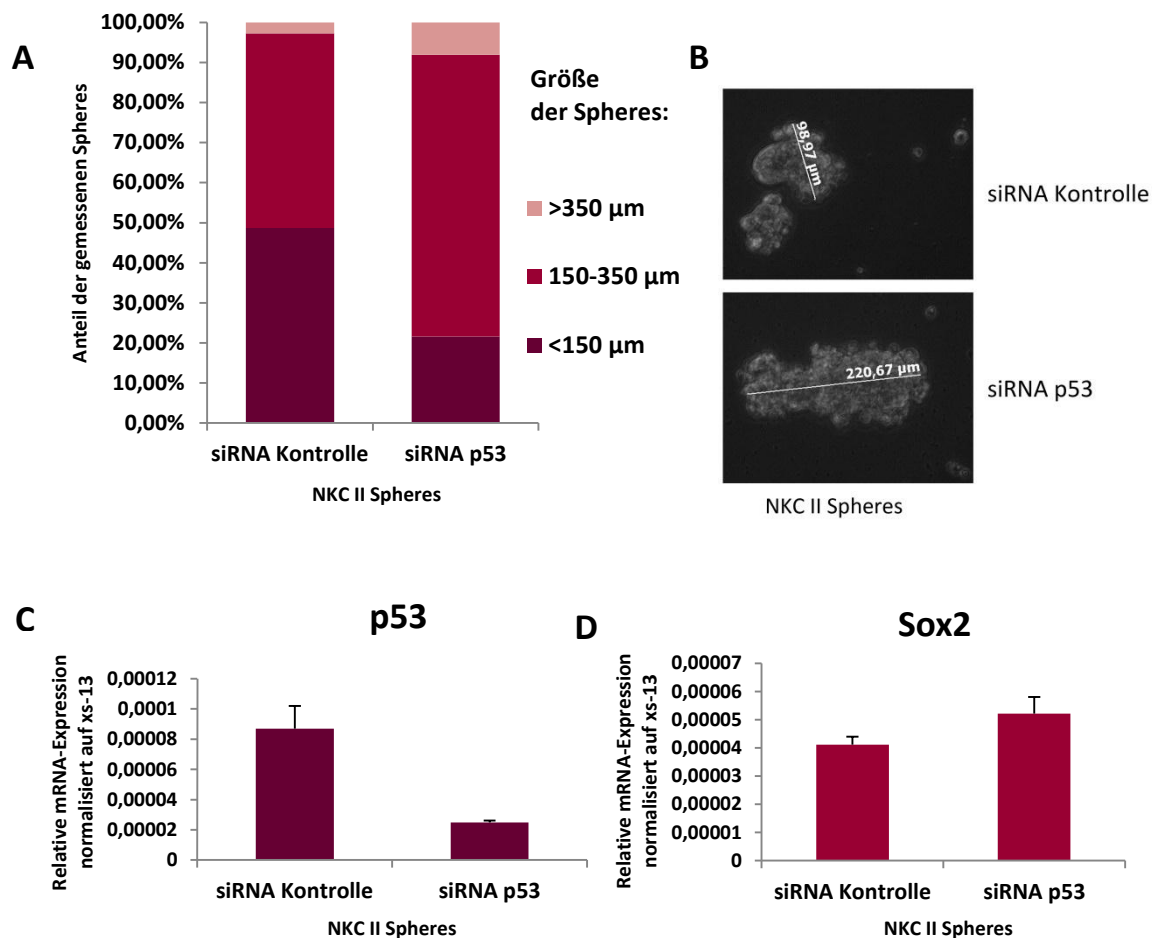


Abb. 22: Einfluss der genetischen Depletion von p53 auf die Sphere-Formation sowie auf die mRNA-Expression von p53 und Sox2 in NKC II Zellen. NKC II Zellen wurden mit gegen p53 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFectTM* behandelt und nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden in Corning Platten überführt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Durchmesser der Spheres gemessen. In Abbildung (A) ist die prozentuale Größenverteilung der gemessenen 37 Spheres dargestellt. Abbildung (B) zeigt beispielhaft Spheres aus beiden Gruppen. Zudem wurde RNA aus den Spheres isoliert und das Expressionsverhalten von p53 und Sox2 mittels RT-qPCR analysiert. Abbildung (C) zeigt die Kontrolle des *knockdowns* von p53 und Abbildung (D) die relative mRNA-Expression von Sox2. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die genetische Depletion des Tumorsuppressors p53 zu einer Zunahme bestimmter Stammzellregulatoren und zu einer Steigerung von Stammzeleigenschaften führt. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sollen im Folgenden analysiert werden.

5.3 MicroRNAs vermitteln die Reprimierung von Stammzellfaktoren durch den Tumorsuppressor p53

Der Tumorsuppressor p53 reguliert viele seiner Zielgene mittels microRNAs. Die microRNAs 34a und 200c wurden bereits als wichtige Regulatoren im Pankreas beschrieben (Chang *et al.* 2007; Wellner *et al.* 2009). Um zu ermitteln, ob der Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 in den untersuchten transgenen Mausmodellen zu einer verminderten Expression der microRNAs führt, wurde die Expression der microRNAs 34a und 200c in „NKC p53 Wildtyp“-Tumoren mit der in „NKC p53 Verlust“-Tumoren verglichen. Die Expression von miR-200c ist in NK-Pankreastumoren mit Verlust von p53 stark vermindert im Vergleich zu NK-Pankreastumoren mit intaktem p53, wobei die Expressionsunterschiede statistisch nicht signifikant waren ($p > 0,05$) (Abb. 23B). Bei der Expression von miR-34a war kein Unterschied zu verzeichnen (Abb. 23A).

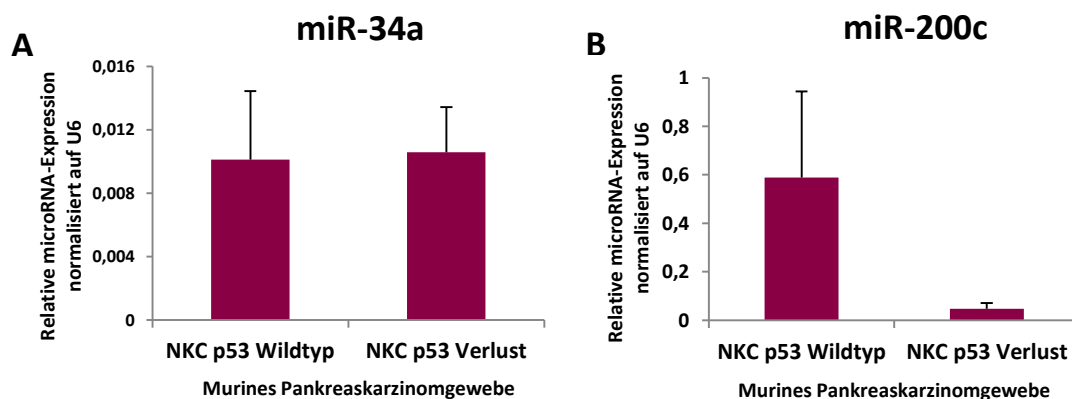


Abb. 23: Expressionsverhalten von microRNA 200c und microRNA 34a in Pankreaskarzinomgewebe mit unterschiedlicher p53 Aktivität. Darstellung des Expressionsverhaltens von microRNA 34a und 200c in Pankreaskarzinomgewebe von NK-Mäusen mit p53 Wildtyp [E829, E902] verglichen mit dem von NK-Mäusen mit p53 Verlust [E1038, E 1055]. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der microRNA-Expression der einzelnen Gewebegruppen relativ zur Expression der snRNA U6 \pm SD.

Auch in Zelllinien mit p53-Mutation oder -Verlust war die Expression von miR-200c deutlich vermindert im Vergleich zu NK II Zellen mit intaktem p53 (Abb. 24). Gleiches gilt für miR-34a, welche in KNPC 001 Zellen und KNPC del3 Zellen im Vergleich zu NK II Zellen eine deutlich geringere Expression zeigte (Abb. 24).

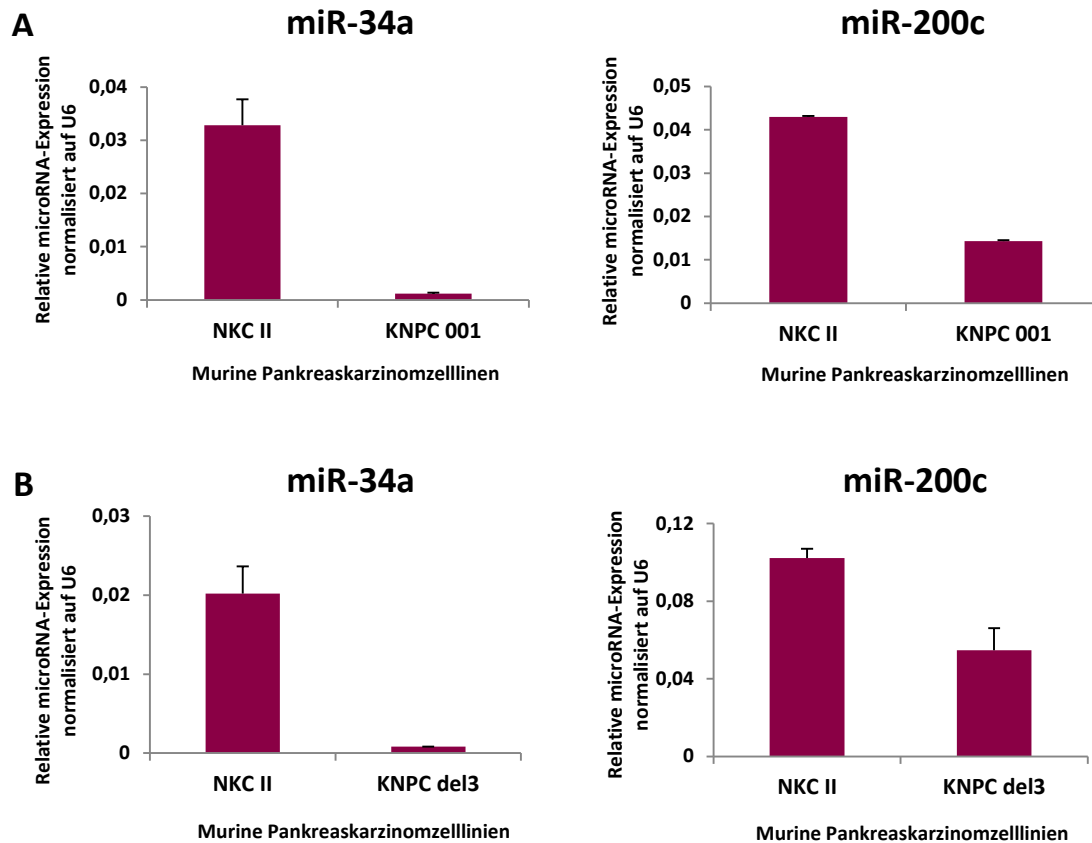


Abb. 24: Expressionsverhalten von microRNA 200c und microRNA 34a in den Pankreaskarzinomzelllinien NKC II, KNPC 001 und KNPC del3. Darstellung der durch RT-qPCR ermittelten Expression von microRNA 34a und 200c in NKC II Zellen mit p53 Wildtyp verglichen mit **(A)** KNPC 001 Zellen mit heterozygoter p53-Mutation bzw. **(B)** KNPC del3 Zellen mit heterozygotem p53-*knockdown*. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung relativ zur Expression der snRNA U6 \pm SD.

Zudem führte die genetische Depletion von p53 in NKC II Zellen zu einem deutlichen Rückgang der Expression von miR-34a und miR-200c (Abb. 25). Diese Ergebnisse weisen zusammenfassend auf eine Regulation der microRNAs 34a und 200c durch p53 im Pankreas hin. Ein Verlust von p53 geht in den untersuchten transgenen Mausmodellen mit einem Verlust der microRNAs 34a und 200c einher.

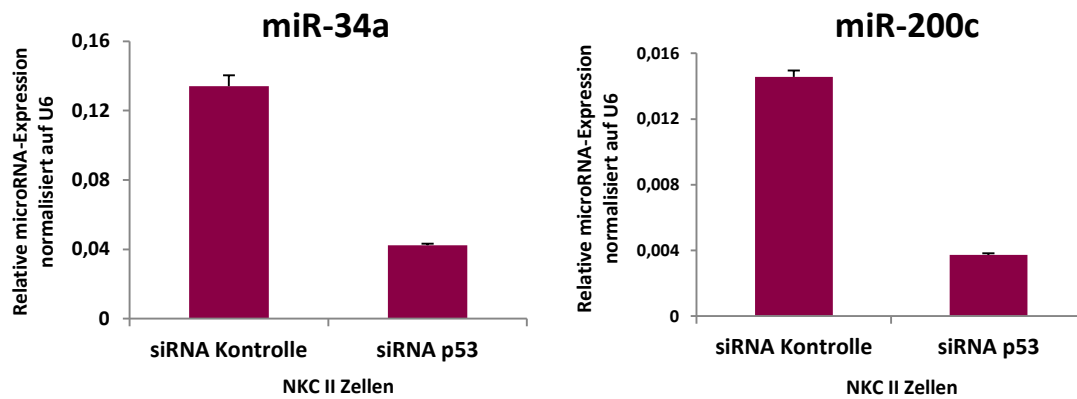


Abb. 25: Auswirkung der genetischen Depletion von p53 auf die Expression von microRNA 34a und 200c in NKC II Zellen. NKC II Zellen wurden mit gegen p53 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect™* behandelt. Nach 24 Stunden wurde microRNA gewonnen und mittels RT-qPCR microRNA 34a und microRNA 200c amplifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf die snRNA U6 normalisierten microRNA-Expression \pm SD.

Ob die microRNAs 34a und 200c den inhibitorischen Effekt von p53 gegenüber Stammzellfaktoren vermitteln, wurde durch Überexpression sowie Inhibition der microRNAs in Zelllinien ermittelt. Die Überexpression von miR-200c in KNPC 001 Zellen führte zu einem deutlichen Rückgang der mRNA- sowie der Proteinexpression von Sox2 (Abb. 26B+C). Die Überexpression von miR-34a in KNPC 001 Zellen führte hingegen nur zu einem leichten Rückgang der mRNA- sowie Proteinexpression von Sox2 (Abb. 26B+C). Die mRNA-Expression von Bmi1 wurde durch Überexpression von miR-200c in KNPC 001 Zellen leicht vermindert, während Überexpression von miR-34a keinen Effekt auf die mRNA-Expression von Bmi1 zeigte. Es konnte eine verminderte Proteinexpression von Klf4 nach Überexpression von miR-200c, nicht aber von miR-34a beobachtet werden.

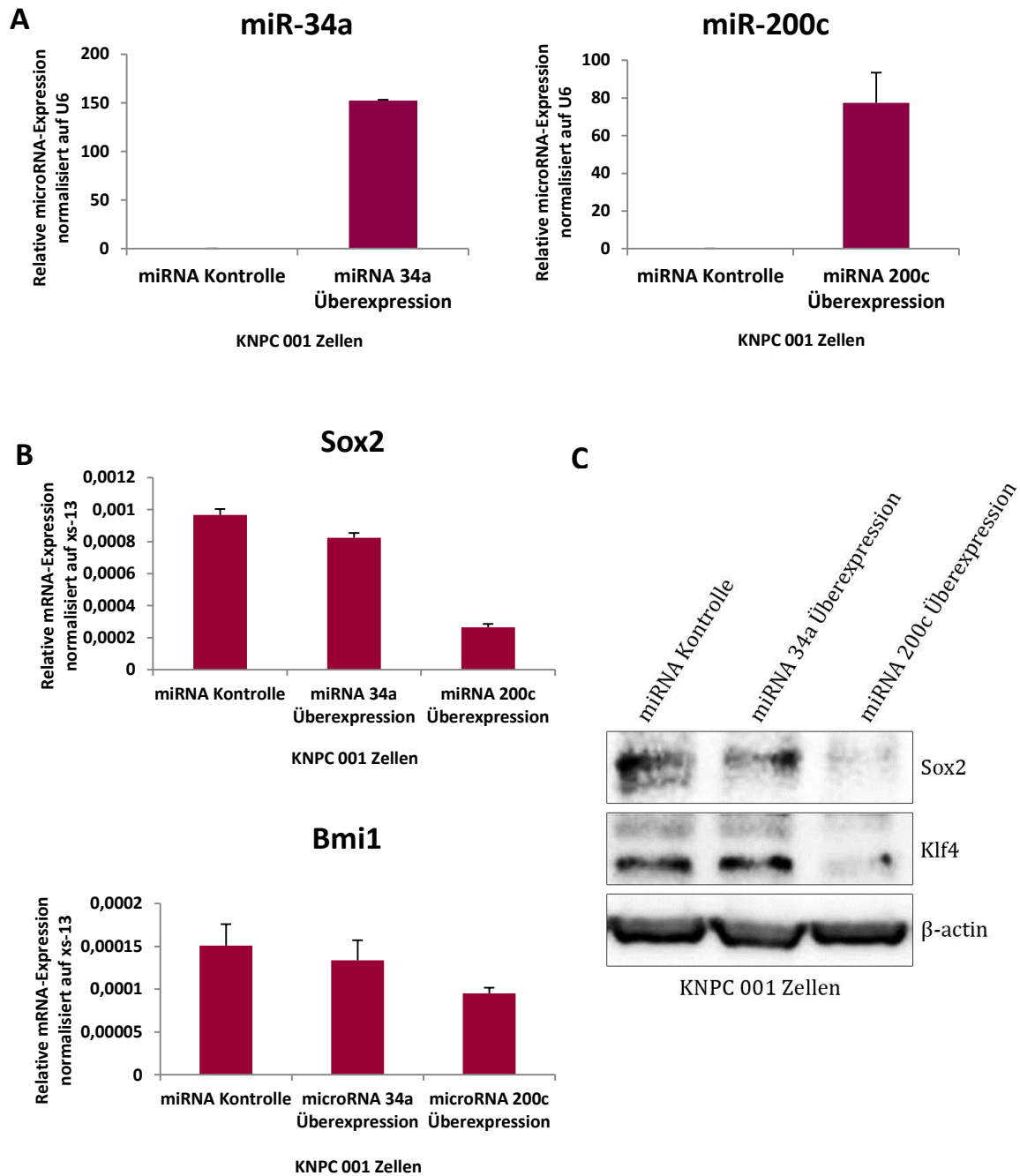


Abb. 26: Einfluss der Überexpression von microRNA 34a und 200c auf die Expression von Sox2, Klf4 und Bmi1 in KNPC 001 Zellen. In KNPC 001 Zellen wurden mittels miRNA-Mimic microRNA 34a bzw. 200c überexprimiert. Die Kontrolle wurde nur mit Lipofectamin behandelt. Abbildung (A) zeigt die Kontrolle der Überexpression von microRNA 34a und 200c nach 24-stündiger Transfektion. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf U6 normalisierten microRNA-Expression \pm SD. Abbildung (B) demonstriert die Mittelwerte der Dreifachbestimmung, der auf xs-13 bezogenen mRNA-Expression von Sox2 und Bmi1 \pm SD. (C) Die Proteinexpression von Sox2 und Klf4 nach der Überexpression von microRNA 34a bzw. 200c wurde mittels Western Blot analysiert. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Auch auf die mRNA-Expression von Klf4 zeigte die Überexpression von miR-200c in KNPC 001 Zellen einen negativen Effekt (Abb. 27A). In KNPC del3 Zellen mit genetischem Verlust von p53 wurde ebenfalls ein negativer Effekt der Überexpression von miR-200c auf die mRNA-Expression von Sox2 beobachtet (Abb. 27B).

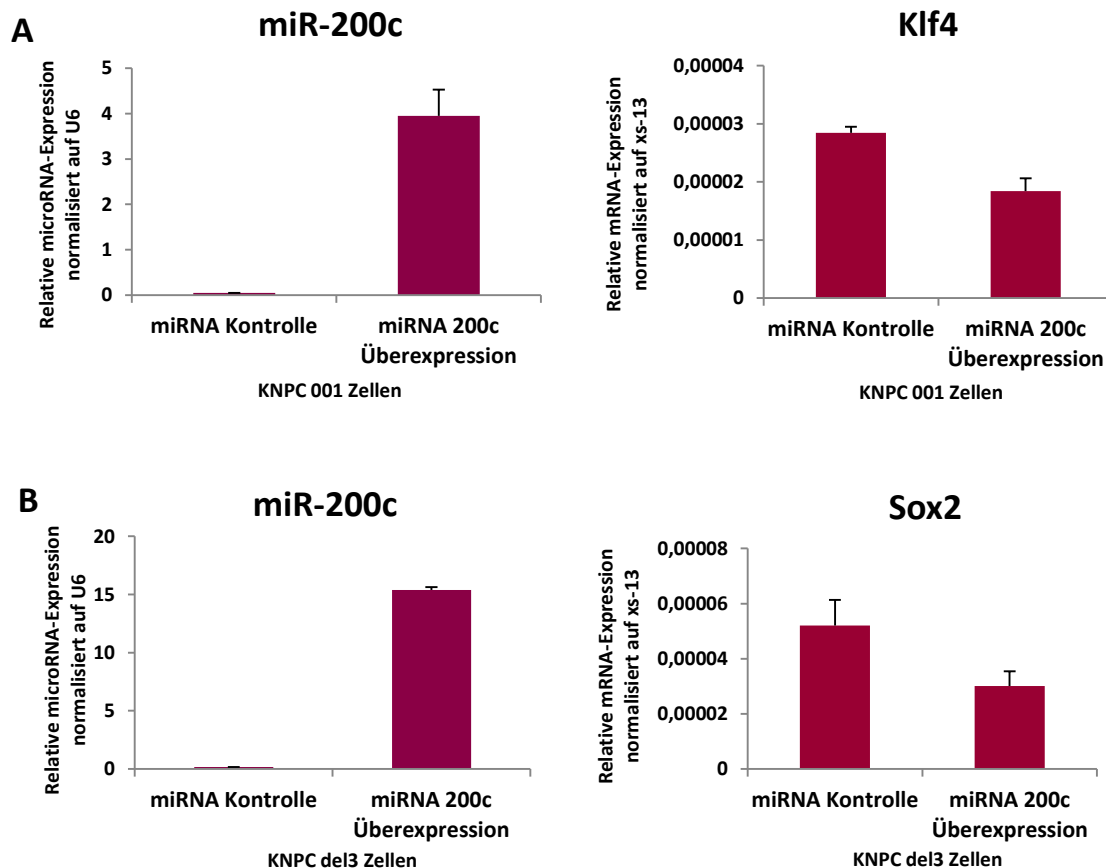


Abb. 27: Einfluss der Überexpression von miR-200c auf die Expression von Sox2 und Klf4 in KNPC 001 und KNPC del3 Zellen. In KNPC 001 (**A**) und KNPC del3 (**B**) Zellen wurde mittels miRNA-Mimic microRNA 200c überexprimiert. Die Kontrolle wurde nur mit Lipofectamin behandelt. Links ist jeweils die Kontrolle der Überexpression von microRNA 200c dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung die snRNA U6 normalisierten microRNA-Expression \pm SD. Die jeweils rechten Schaubilder zeigen die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 bezogenen mRNA-Expression von Klf4 (**A**) und Sox2 (**B**) \pm SD.

Passend zu der Beobachtung, dass die Reexpression der miRNAs in Zellen mit Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 zu einer Repression der Stammzellfaktoren führt, hatte die Inhibition der miRNAs 200c und 34a in Zellen mit intaktem p53 einen Anstieg der Proteinexpression von Sox2 und Klf4 zufolge (Abb. 28).

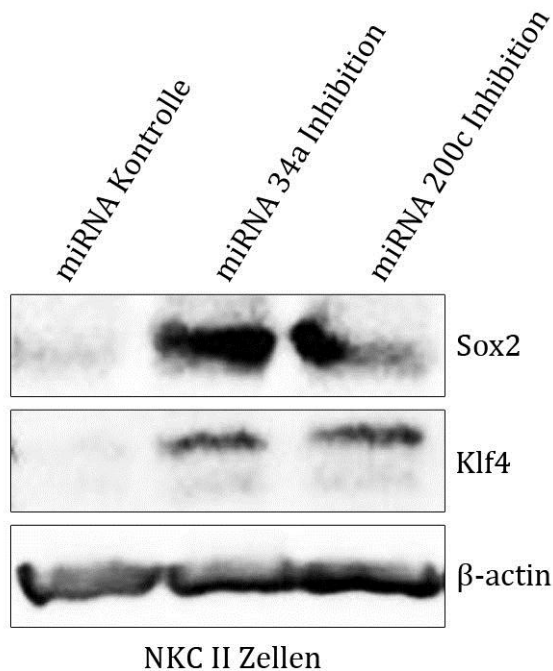


Abb. 28: Einfluss der Inhibition von microRNA 34a und microRNA 200c auf die Expression von Sox2 und Klf4 in NKC II Zellen. In NKC II Zellen wurden mittels miRNA-Inhibitor die microRNAs 34a und 200c inhibiert. Die Kontrolle wurde nur mit Lipofectamin behandelt. Das nach 24 Stunden gewonnene Gesamtzelllysate wurde mittels Western Blot auf die Expression von Sox2 und Klf4 untersucht. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Um zu ermitteln, ob die Reexpression von miR-200c in KNPC 001 Zellen auch einen Effekt auf die Stammzeleigenschaften der Tumorzellen hat, wurde ein Sphere-Assay nach Überexpression von miR-200c in KNPC 001 Zellen durchgeführt. Die Überexpression von miR-200c führte zu einem Rückgang der Sphere-Formation sowie zu einer Abnahme der mRNA-Expression von Sox2 (Abb. 29).

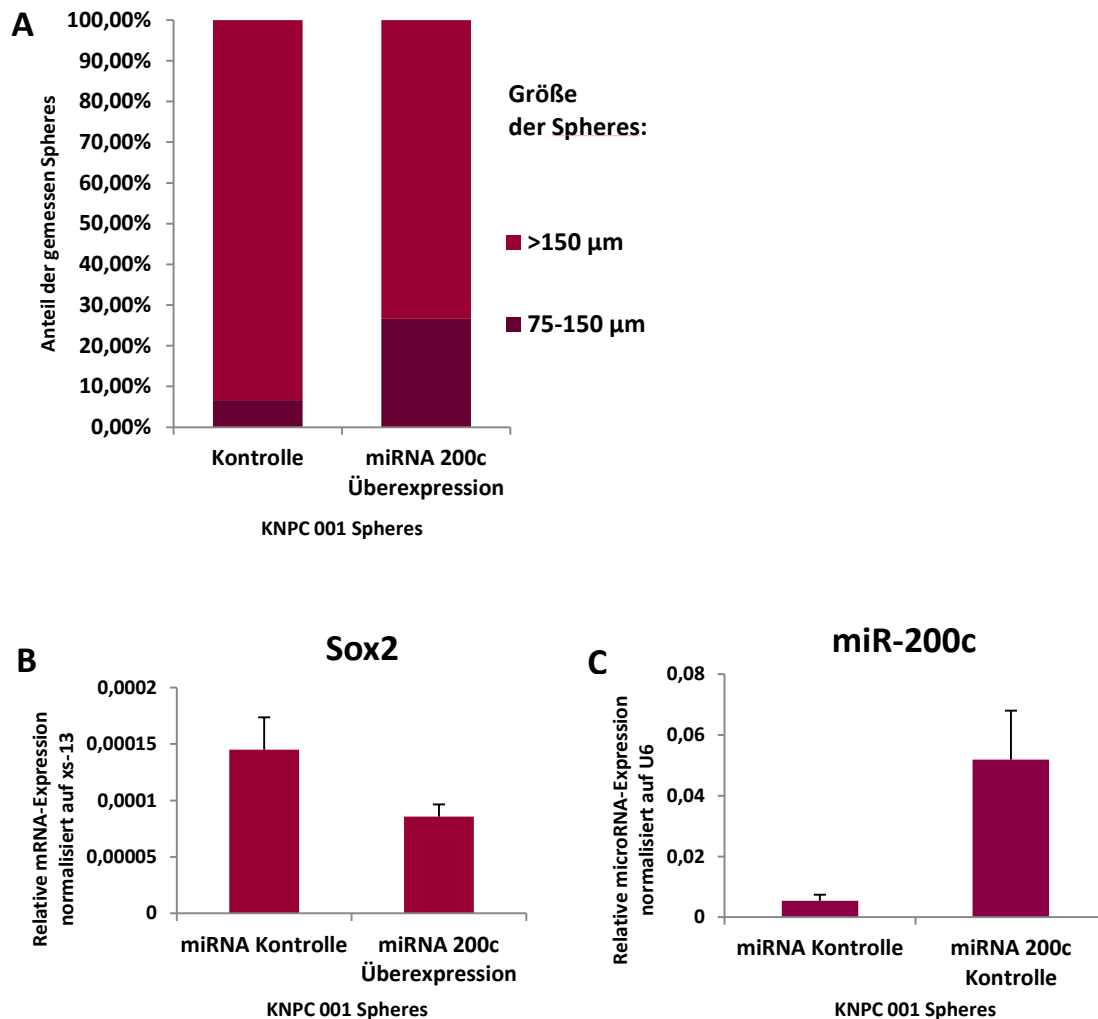


Abb. 29: Einfluss der Überexpression von microRNA 200c auf die Sphere-Formation und die Expression von Sox2 in KNPC 001 Zellen. In KNPC 001 Zellen wurde mittels miRNA-Mimic microRNA 200c überexprimiert. Die Kontrolle wurde nur mit Lipofectamin behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf Corning Platten überführt. Nach weiteren 48 Stunden wurde der Durchmesser der Spheres gemessen. In Abbildung (A) ist die prozentuale Größenverteilung der 15 gemessenen Spheres dargestellt. (B) Zudem wurde RNA aus den Spheres isoliert und das Expressionsverhalten von Sox2 mittels RT-qPCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD. Abbildung (C) zeigt die Kontrolle der Überexpression von microRNA 200c. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf die snRNA U6 normalisierten microRNA-Expression \pm SD.

Zusammenfassend zeigen diese Daten einen supprimierenden Effekt von miR-200c auf die Expression der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4 und Bmi1 sowie einen negativen Effekt auf die Bildung von Spheres.

5.4 Die Inhibition von NFATc1 resultiert in einer verminderten Expression von Stammzellregulatoren

Die Rolle von NFATc1 im Pankreaskarzinom wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (Buchholz und Ellenrieder 2007; Baumgart *et al.* 2012). Inwiefern NFATc1 die Differenzierung des Pankreaskarzinoms beeinflusst, wurde allerdings noch nicht genauer untersucht. Die Beobachtung, dass Pankreastumore der transgenen Mäuse mit dem Genotyp KPC (*Kras*^{G12D}-Mutation, *Trp53*^{R172H}-Mutation, *Pdx1-Cre*) (Hingorani *et al.* 2005) einen deutlich besser differenzierten Phänotyp ausweisen als die transgenen Mausmodelle KNPC und KNP^{+/-}C mit konstitutiver Aktivierung von NFATc1, legt die Hypothese nahe, dass NFATc1 zu einem entdifferenzierten Phänotyp beiträgt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Expression der Stammzellfaktoren in Pankreastumoren von KPC-Mäusen und KNP^{+/-}C-Mäusen verglichen.

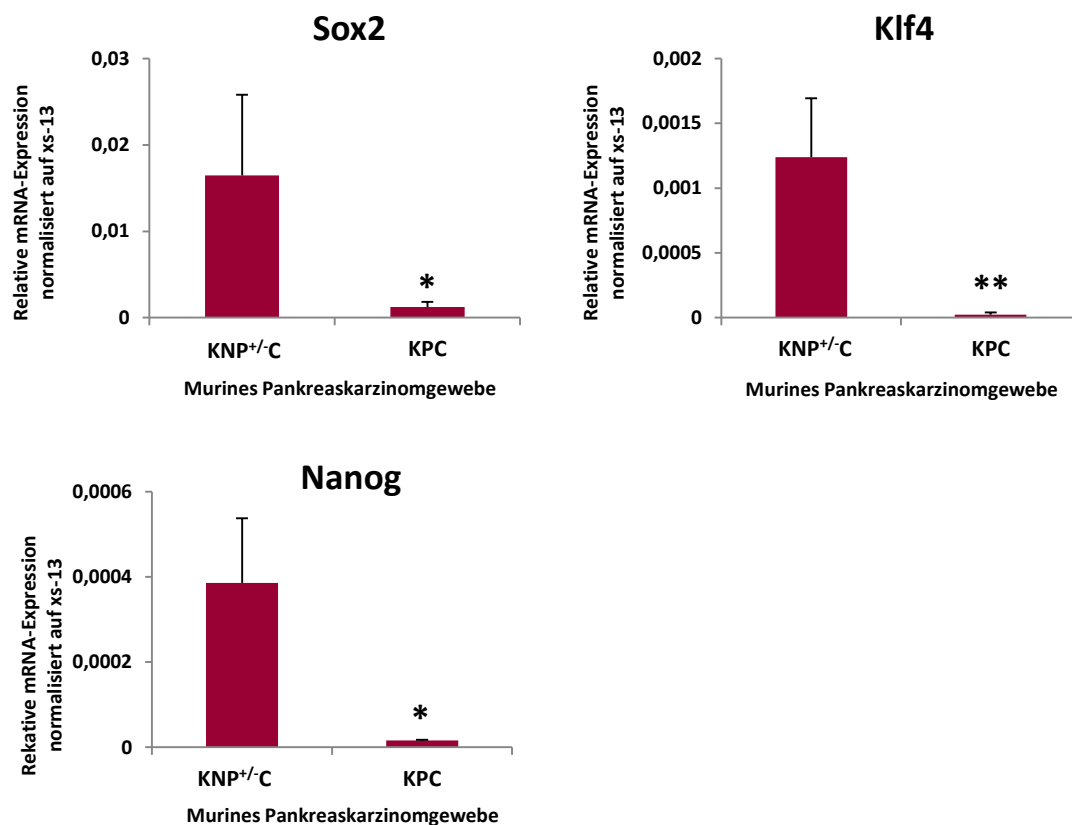


Abb. 30: Expressionsverhalten von Sox2, Klf4 und Nanog in Pankreaskarzinomgewebe unterschiedlichen Genotyps. Aus murinem Pankreaskarzinomgewebe von KNP^{+/-}C-Mäusen [E1678, E1679, E1681] und KPC-Mäusen [4338, 5929, 6198] wurde RNA isoliert und Sox2, Klf4 und Nanog amplifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression der beiden Gruppen \pm SD sowie die Signifikanzniveaus (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

In KNP^{+/C}-Tumoren findet sich eine signifikant höhere mRNA-Expression von Sox2, Klf4 und Nanog als in KPC-Pankreastumoren (Abb. 30). Die Proteinexpression von Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 ist in KPC-Tumoren deutlich geringer als in KNPC-Tumoren (Abb. 31).

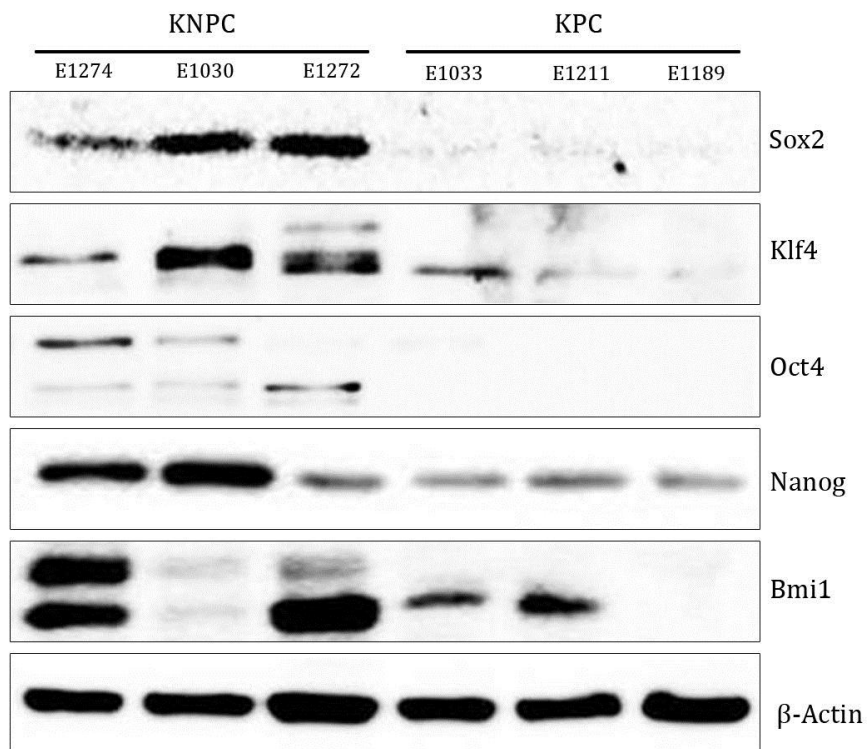


Abb. 31: Expressionsverhalten von Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 in Pankreaskarzinomgewebe. Aus murinem Pankreaskarzinomgewebe von KNPC-Mäusen [E1274, E1030, E1272] und von KPC-Mäusen [E1030, E1211, E1189] wurde Protein gewonnen und dieses durch Western Blot auf die Expression von Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 untersucht. β-Actin diente zur Ladekontrolle.

Um den direkten Einfluss von NFATc1 auf die Expression der Stammzellfaktoren zu evaluieren, wurde in verschiedenen Zelllinien NFATc1 genetisch entfernt oder pharmakologisch gehemmt. Die genetische Depletion von NFATc1 in KNPC 001 Zellen führte zu einer verminderten mRNA-Expression von Sox2 und Bmi1 (Abb. 32) sowie zu einer verminderten Proteinexpression von Sox2, Klf4, Oct4 und Bmi1 (Abb. 33).

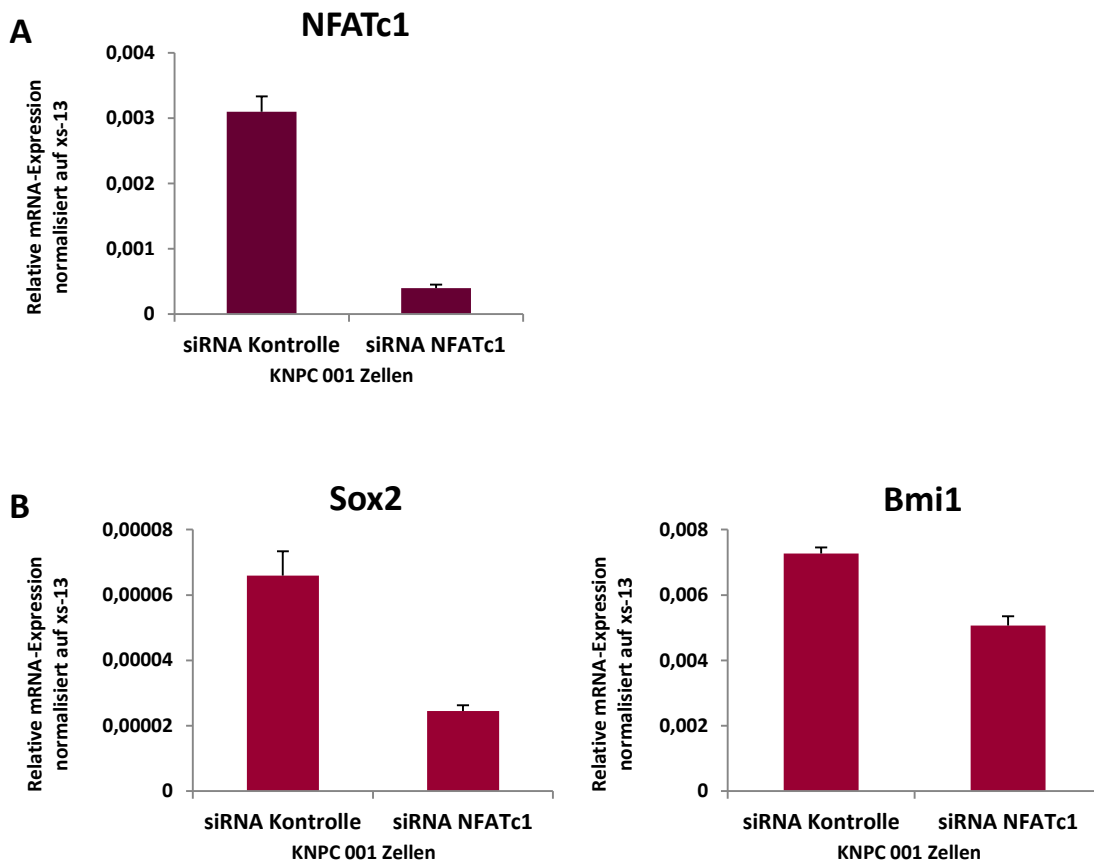


Abb. 32: Einfluss der genetischen Depletion von NFATc1 auf die mRNA-Expression von Sox2 und Bmi1 in KNPC 001 Zellen. Darstellung der durch RT-qPCR ermittelten mRNA-Expression von NFATc1, Sox2 und Bmi1 in KNPC 001 Zellen nach 24-stündiger Transfektion mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA bzw. alleiniger Behandlung mit siLentFect™ als Kontrolle. Abbildung **(A)** stellt die Kontrolle des *knockdowns* von NFATc1 dar und Abbildung **(B)** die relative mRNA-Expression von Sox2 und Bmi1. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD.

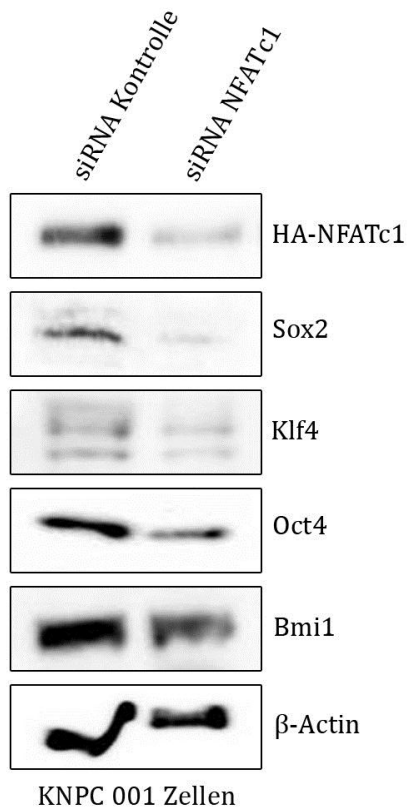


Abb. 33: Auswirkung der genetischen Depletion von NFATc1 auf die Proteinexpression von Sox2, Klf4, Oct4, und Bmi1 in KNPC 001 Zellen. KNPC 001 Zellen wurden mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect*TM behandelt. Das nach 24 Stunden gewonnene Gesamtzelllysate wurde mittels Western Blot auf die Expression von HA-NFATc1, Sox2, Klf4, Oct4, und Bmi1 untersucht. β-Actin diente als Ladekontrolle.

Die pharmakologische Inhibition von NFATc1 durch den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) zeigte ähnliche Effekte. In KNPC 001 Zellen ist nach Behandlung mit CsA ein deutlicher Rückgang der mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Nanog und Bmi1 zu beobachten (Abb. 34).

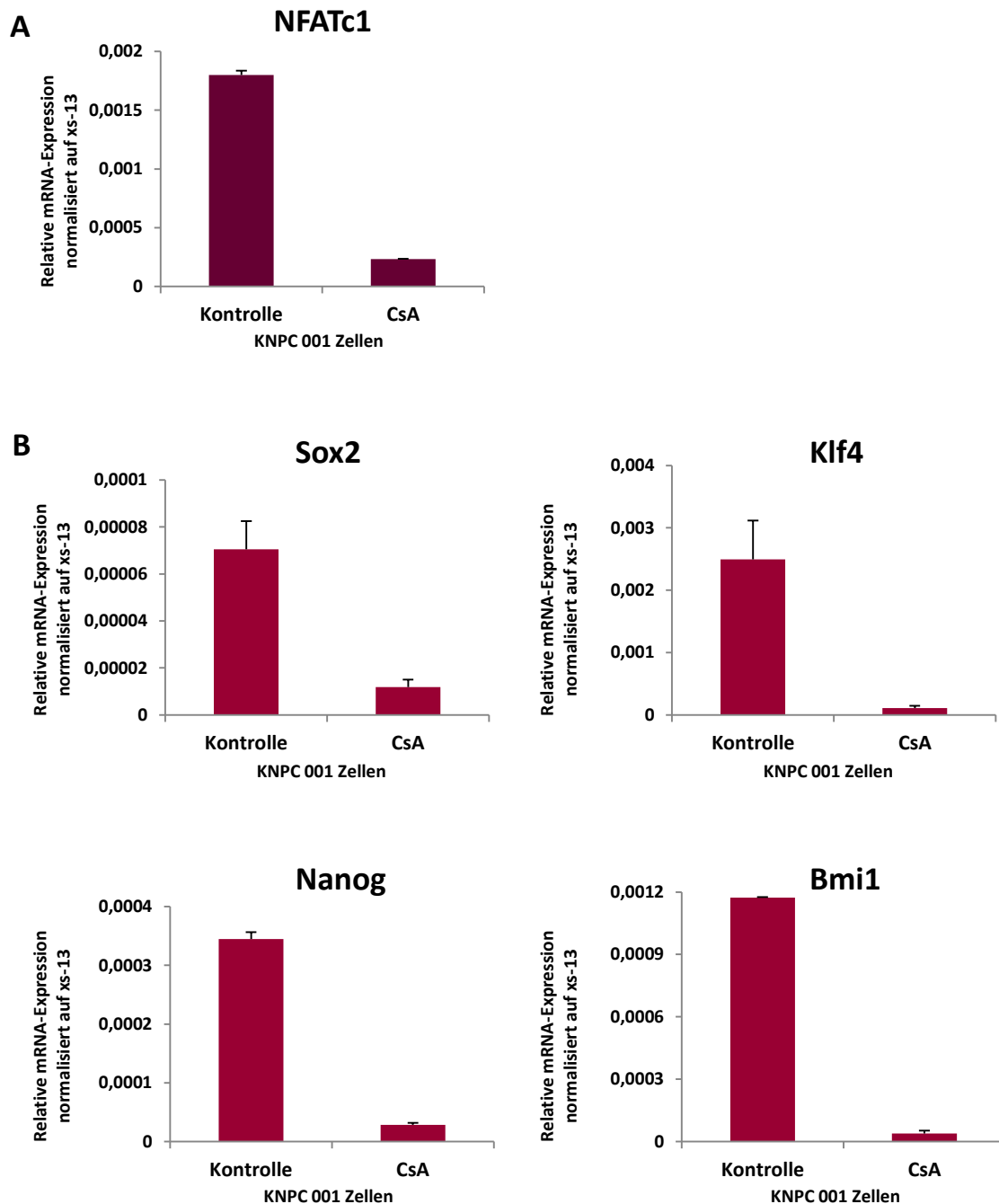


Abb. 34: Einfluss von Cyclosporin A auf die mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Nanog und Bmi1 in KNPC 001 Zellen. Darstellung der durch RT-qPCR ermittelten mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Nanog und Bmi1 in KNPC 001 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μ M CsA bzw. H₂O als Kontrolle. In Abbildung (A) ist die Kontrolle der CsA-vermittelten Abnahme von NFATc1 und in Abbildung (B) die relative mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Nanog und Bmi1 dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD.

Diese Ergebnisse konnten außerdem in humanen Pankreaskarzinomzelllinien bestätigt werden. Die genetische Depletion von NFATc1 in Panc-1 Zellen führte zu einer verminderten mRNA-Expression (Abb. 35B) sowie zu einem leichten Rückgang der Proteinexpression von Sox2 (Abb. 35C). Die pharmakologische Inhibition von NFATc1 durch CsA in Panc-1 Zellen hatte negative Effekte auf die mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog (Abb. 36).

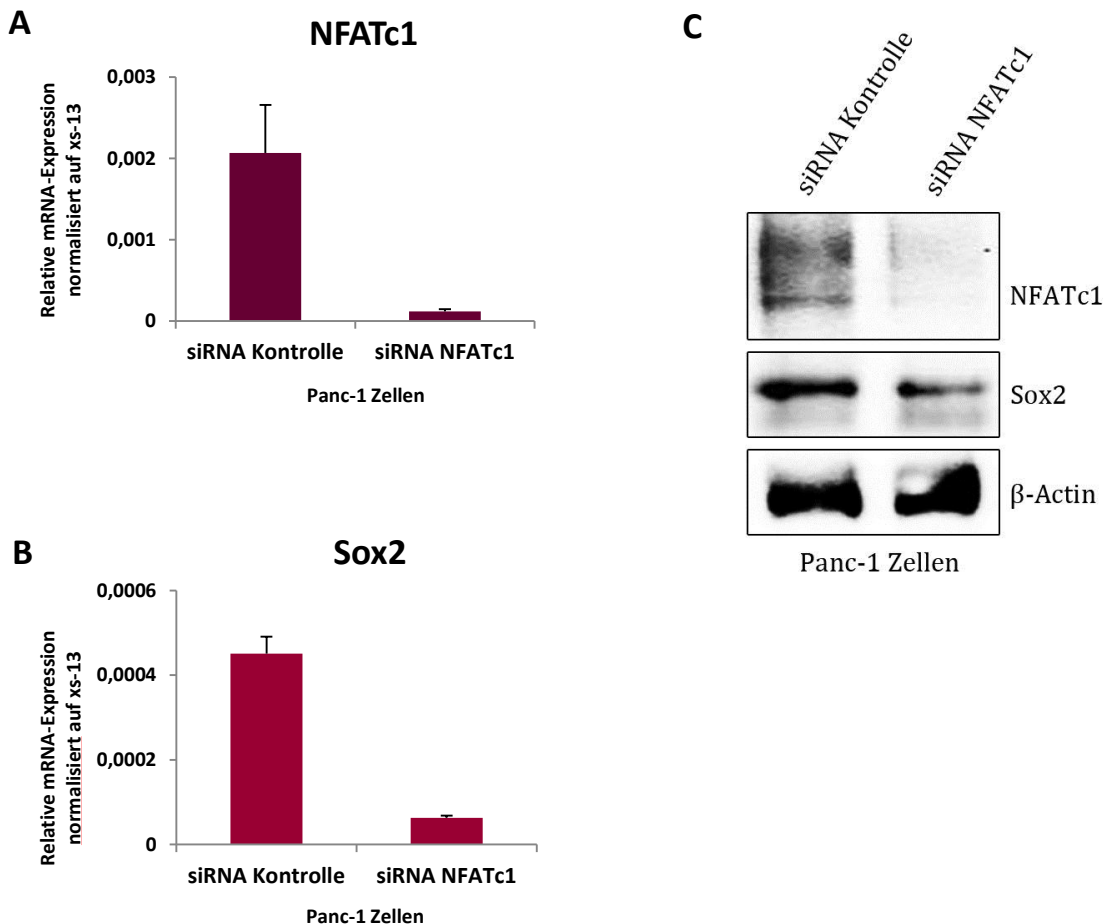


Abb. 35: Einfluss der genetischen Depletion von NFATc1 auf die mRNA- und Proteinexpression von NFATc1 und Sox2 in Panc-1 Zellen. Panc-1 Zellen wurden mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect™* behandelt. Nach 24 Stunden wurde RNA sowie Gesamtzelllysat gewonnen. In Abbildung **(A)** ist die Kontrolle des *knockdowns* von NFATc1 dargestellt und in Abbildung **(B)** die relative mRNA-Expression von Sox2. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD. **(C)** Der Western Blot zeigt die Proteinexpression von NFATc1 und Sox2. β -Actin diente als Ladekontrolle.

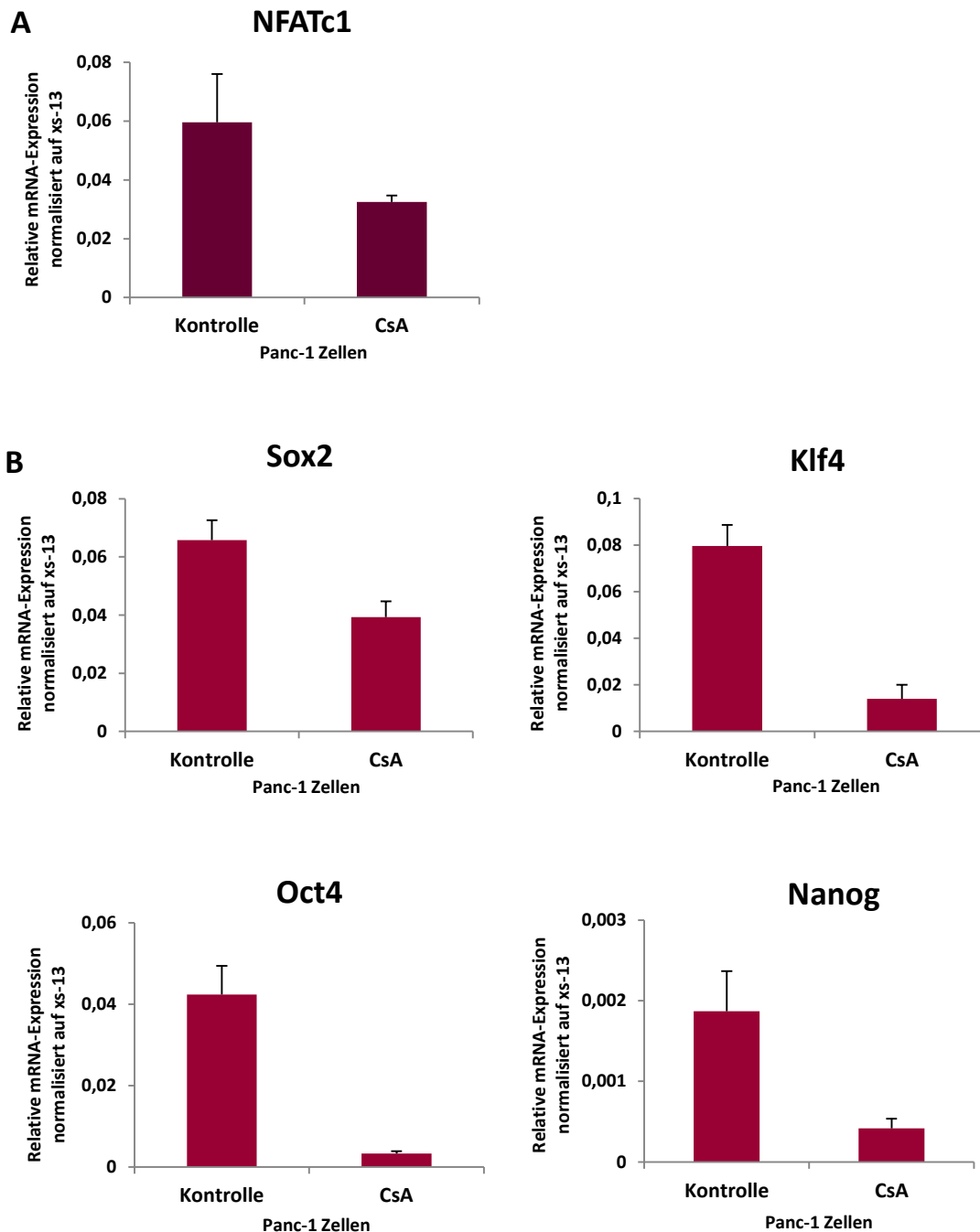


Abb. 36: Einfluss von Cyclosporin A auf die mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog in Panc-1 Zellen. Darstellung der durch RT-qPCR ermittelten mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog in Panc-1 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μ M CsA bzw. H₂O als Kontrolle. In Abbildung **(A)** ist die Kontrolle der CsA-vermittelten Abnahme von NFATc1 und in Abbildung **(B)** die relative mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD.

In der humanen Pankreaskarzinomzelllinie L3.6 führte die pharmakologische Inhibition von NFATc1 durch CsA zu einer verminderten mRNA-Expression von Sox2 und Klf4 (Abb. 37B) sowie zu einem Rückgang der Proteinexpression von Sox2 (Abb. 37C).

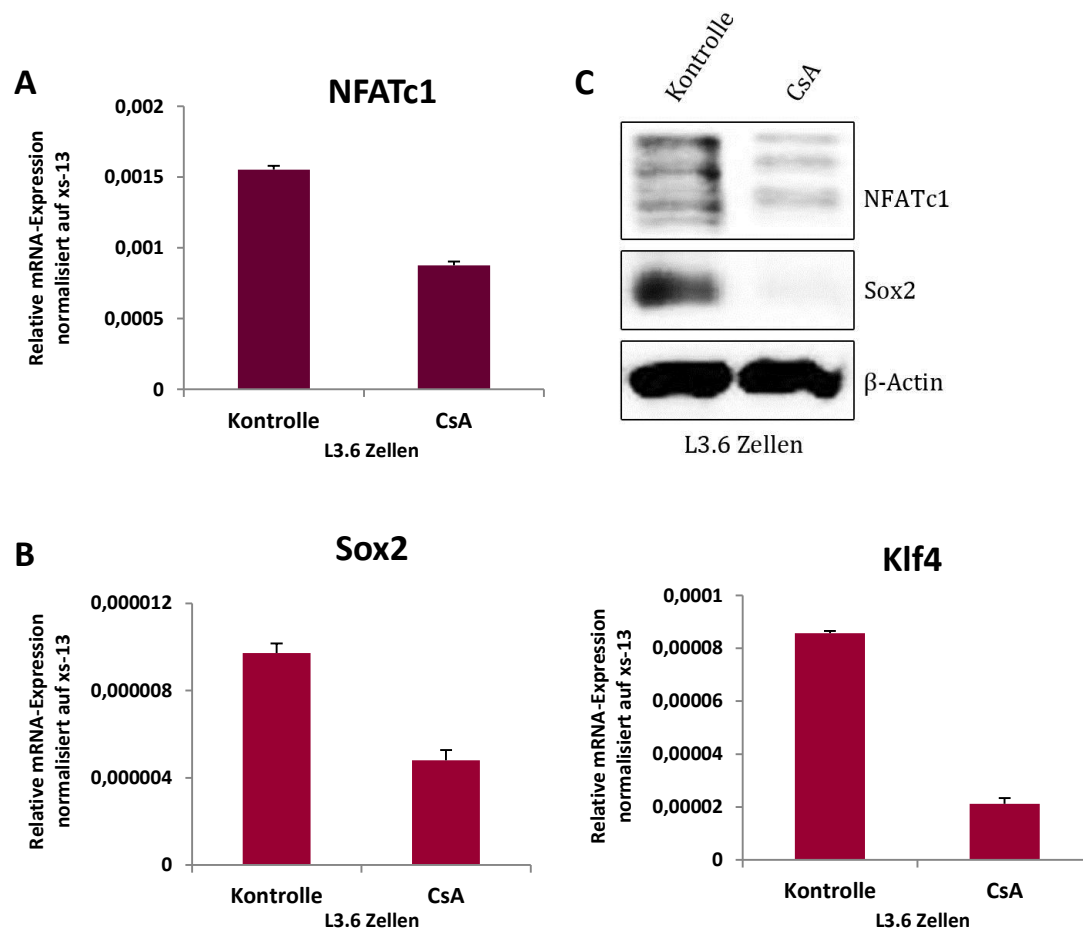


Abb. 37: Einfluss von CsA auf die Expression von NFATc1, Sox2 und Klf4 in L3.6 Zellen. L3.6 Zellen wurden mit 1 μ M CsA behandelt. Als Kontrolle wurde H₂O verwendet. Nach 24 Stunden wurde RNA und Gesamtzelllysat gewonnen. Abbildung **(A)** demonstriert die CsA-vermittelte Abnahme von NFATc1 und Abbildung **(B)** die relative mRNA-Expression von Sox2 und Klf4. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD. **(C)** Der Western Blot zeigt die Proteinexpression von NFATc1 und Sox2. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend weisen diese Daten auf eine direkte Regulation der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 durch NFATc1 im Pankreaskarzinom hin.

5.5 NFATc1 bindet an den Enhancer von Sox2

Als Transkriptionsfaktor bindet NFATc1 in der Regel an multiple Bindungsstellen im Promotor oder Enhancer seiner Zielgene (Rao *et al.* 1997). Es kann dabei die Transkription seiner Zielgene stimulieren oder inhibieren (Koenig *et al.* 2010a). Um festzustellen, ob NFATc1 die Expression von Sox2 ebenfalls durch Bindung an dessen Promotor bzw. Enhancer reguliert, wurden Chromatinanalysen durchgeführt. Wie in Abb. 38 dargestellt ist, konnte eine Bindung von NFATc1 an den Sox2 Enhancer -4200 in KNPC 001 Zellen mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) nachgewiesen werden.

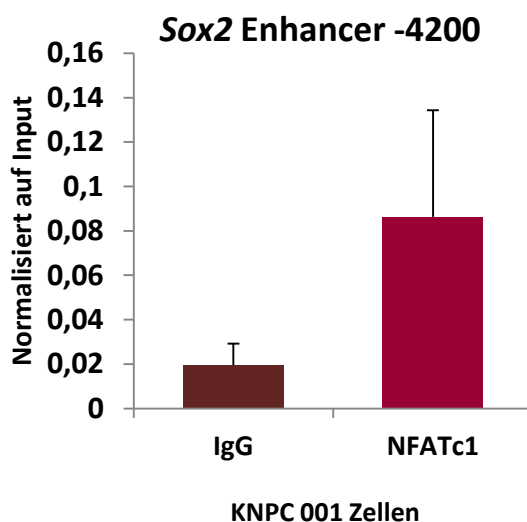


Abb. 38: Direkte Bindung von NFATc1 an Enhancer -4200 von Sox2 in KNPC 001 Zellen. Nach Fixierung mit 37 % Formaldehyd wurde eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) mit Antikörpern gegen NFATc1 durchgeführt. Die *in vivo* Bindung von NFATc1 an den Enhancer -4200 wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Angegeben ist die auf den Input normalisierte Bindung \pm SD. IgG diente als Negativkontrolle.

In der humanen Pankreaskarzinomzelllinie L3.6 wurde ebenfalls eine Chromatinimmunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen NFATc1 sowie gegen die RNA-Polymerase II durchgeführt. In Abb. 39A ist die spezifische Bindung des Transkriptionsfaktors NFATc1 an die SOX2 Enhancer -3900, -1100 und -470 sowie an den SOX2 Promotor +33 dargestellt. Die Rekrutierung der RNA-Polymerase II konnte mit in Richtung Transkriptionsstart zunehmender Bindungsintensität nachgewiesen werden (Abb. 39B). Am SOX2 Promotor +33 findet sich die stärkste Bindung der RNA-Polymerase II. Diese Ergebnisse deuten auf eine direkte Regulation der Transkription des Stammzellfaktors Sox2 durch den Transkriptionsfaktor NFATc1 hin.

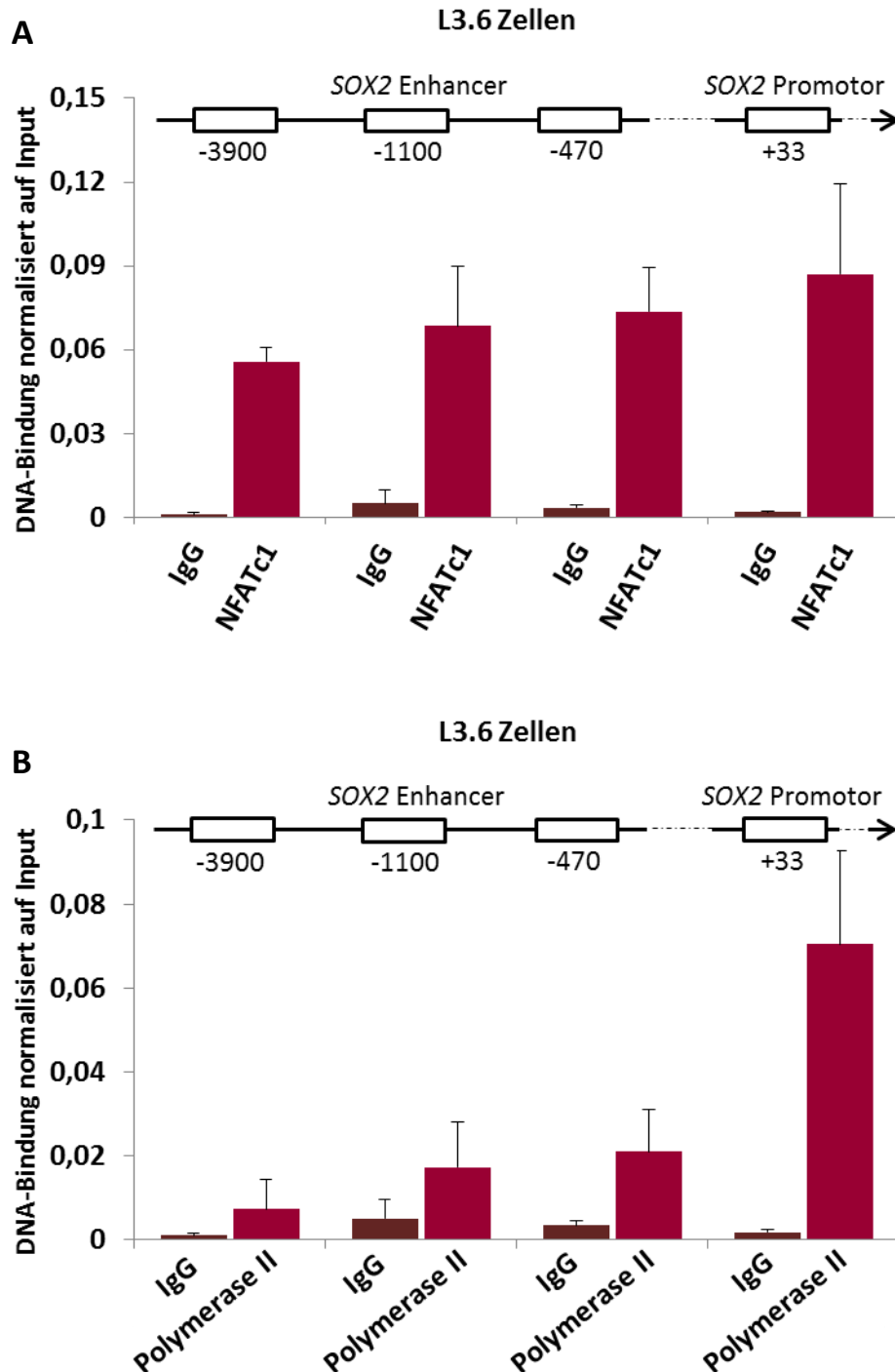


Abb. 39: Direkte Bindung von NFATc1 an Promotor und Enhancer von SOX2 und Rekrutierung von RNA-Polymerase II in L3.6 Zellen. Nach Fixierung mit 37 % Formaldehyd wurde eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Die *in vivo* Bindung von NFATc1 **(A)** und RNA-Polymerase II **(B)** an die Enhancer -3900 und -1100 und die Promotoren -470 und +33 wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Angegeben ist die auf den Input normalisierte Bindung \pm SD. IgG diente als Negativkontrolle.

5.6 NFATc1 ist treibende Kraft der Sphere-Formation durch gesteigerte Expression von Stammzellregulatoren

Die Relevanz von NFATc1 in der Regulation von Stammzeleigenschaften wurde durch Sphere-Assays in unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Vergleicht man die Expression von NFATc1 und von Stammzellfaktoren in epithelialen Zellen mit der in Spheres, beobachtet man eine deutlich höhere mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Nanog und Bmi1 in Spheres (Abb. 40). Die genetische Depletion von NFATc1 in KNPC 001 Zellen führte zu einer deutlich verminderten Fähigkeit zur Bildung von Spheres, begleitet von einem Rückgang der Expression von Sox2, Klf4 und Oct4 (Abb. 41). Ebenso führte die pharmakologische Inhibition von NFATc1 durch CsA zu einer herabgesetzten Sphere-Bildung in KNPC 001 Zellen. Zellen, die zuvor mit CsA behandelt wurden, bildeten weniger und kleinere Spheres und hatten eine deutlich geringere mRNA-Expression der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog (Abb. 42). Auch in KNPC del3 Zellen führte die Inhibition durch den Calcineurin-Antagonisten CsA zu einer verminderten Fähigkeit zur Sphere-Bildung, was mit einer verminderten Expression von NFATc1 sowie der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog einherging (Abb. 43).

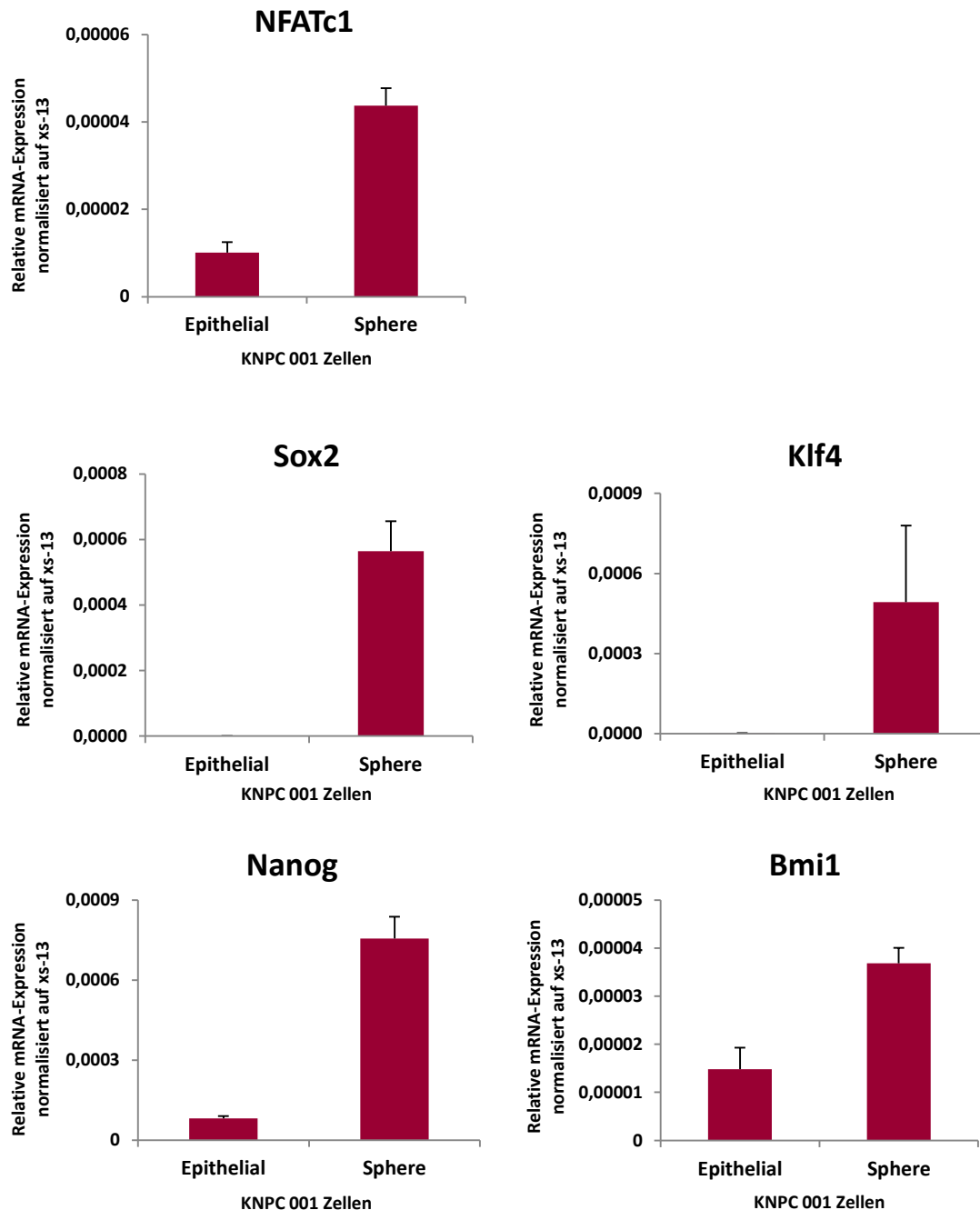


Abb. 40: Expressionsverhalten von NFATc1, Sox2, Klf4, Nanog und Bmi1 in epithelialen Zellen verglichen mit dem in Spheres. KNPC 001 Zellen wurden in Corning Platten überführt und über 48 Stunden kultiviert. Als epitheliale Kontrolle wurden KNPC 001 Zellen über denselben Zeitraum unter adhärennten Bedingungen kultiviert. Nach 48 Stunden wurde RNA gewonnen und NFATc1, Sox2, Klf4, Nanog und Bmi1 mittels RT-qPCR amplifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen mRNA-Expression \pm SD relativ zum Referenzgen xs-13.

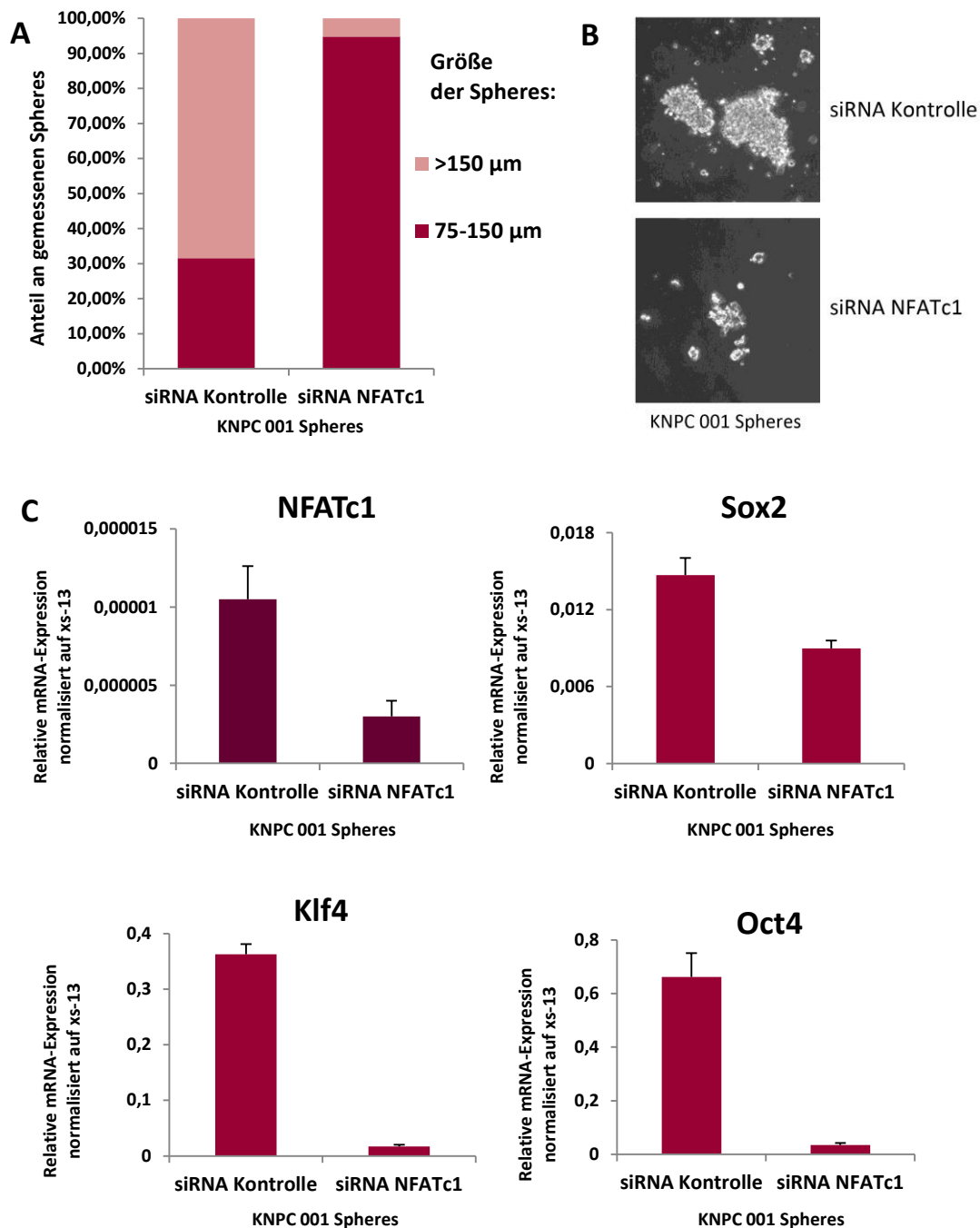


Abb. 41: Auswirkung der genetischen Depletion von NFATc1 auf die Sphere-Formation und die mRNA-Expression von Sox2, Klf4 und Oct4 in KNPC 001 Zellen. KNPC 001 Zellen wurden mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect*TM behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf Corning Platten überführt und nach weiteren 48 Stunden wurden die Durchmesser der Spheres gemessen. Abbildung (A) demonstriert die prozentuale Größenverteilung der jeweils 19 gemessenen Spheres. Abbildung (B) zeigt beispielhaft Spheres aus beiden Gruppen. (C) Die relative mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4 und Oct4 wurde mittels RT-qPCR untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung, der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD.

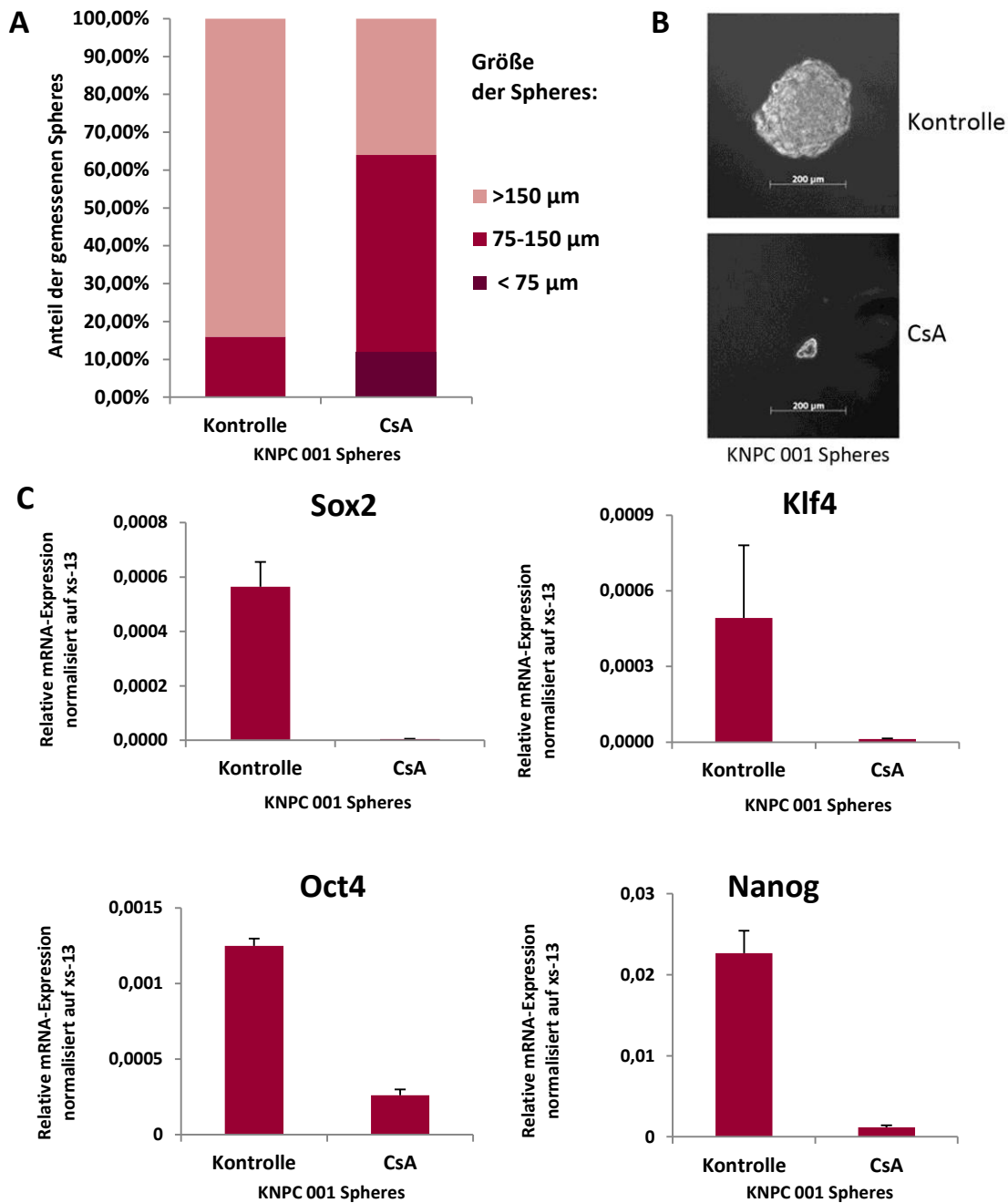


Abb. 42: Einfluss von Cyclosporin A auf die Sphere-Formation und die mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog in KNPC 001 Zellen. KNPC 001 Zellen wurden auf Corning Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 1 µM CsA bzw. als Kontrolle mit demselben Volumen H₂O behandelt. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und anschließend erneut mit derselben Menge CsA behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Durchmesser der Spheres gemessen. Abbildung (A) demonstriert die prozentuale Größenverteilung der jeweils 25 gemessenen Spheres. Abbildung (B) zeigt beispielhaft Spheres aus beiden Gruppen. (C) Zudem wurde RNA aus den Spheres gewonnen und das Expressionsverhalten von Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog mittels RT-qPCR untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD.

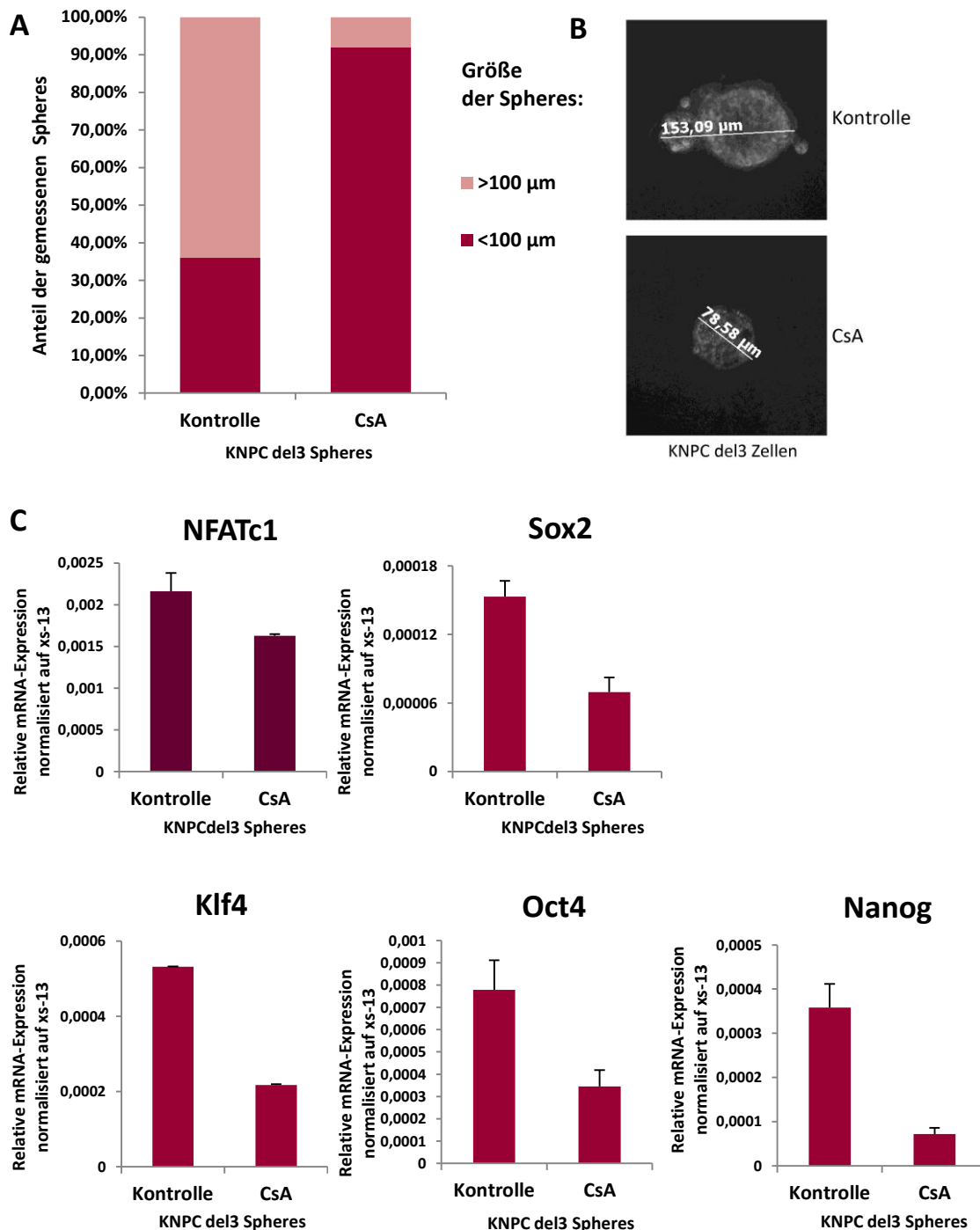


Abb. 43: Einfluss von Cyclosporin A auf die Sphere-Formation und die mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog in KNPC del3 Zellen. In Corning Platten wurden je 500.000 KNPC del3 Zellen ausgesät und dort mit 1 µM CsA behandelt. Als Kontrolle wurde H₂O verwendet. Nach 72 Stunden wurde das Medium gewechselt und daraufhin zweimal im Abstand von 24 Stunden mit 1 µM CsA behandelt. Nach insgesamt 120 Stunden Kultivierung in den Corning Platten wurden die Durchmesser der Spheres gemessen. Abbildung (A) demonstriert die prozentuale Größenverteilung der jeweils 25 gemessenen Spheres. Abbildung (B) zeigt beispielhaft Spheres beider Gruppen. (C) Zudem wurde RNA aus den Spheres gewonnen und NFATc1, Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog mittels RT-qPCR amplifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression ± SD.

Die humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6 besitzt ebenfalls die Fähigkeit zur Bildung von Spheres. Auch in diesen Zelllinien führte die genetische Depletion von NFATc1 zu verminderter Bildung großer Spheres sowie zu einer geringeren Proteinexpression von Sox (Abb. 44).

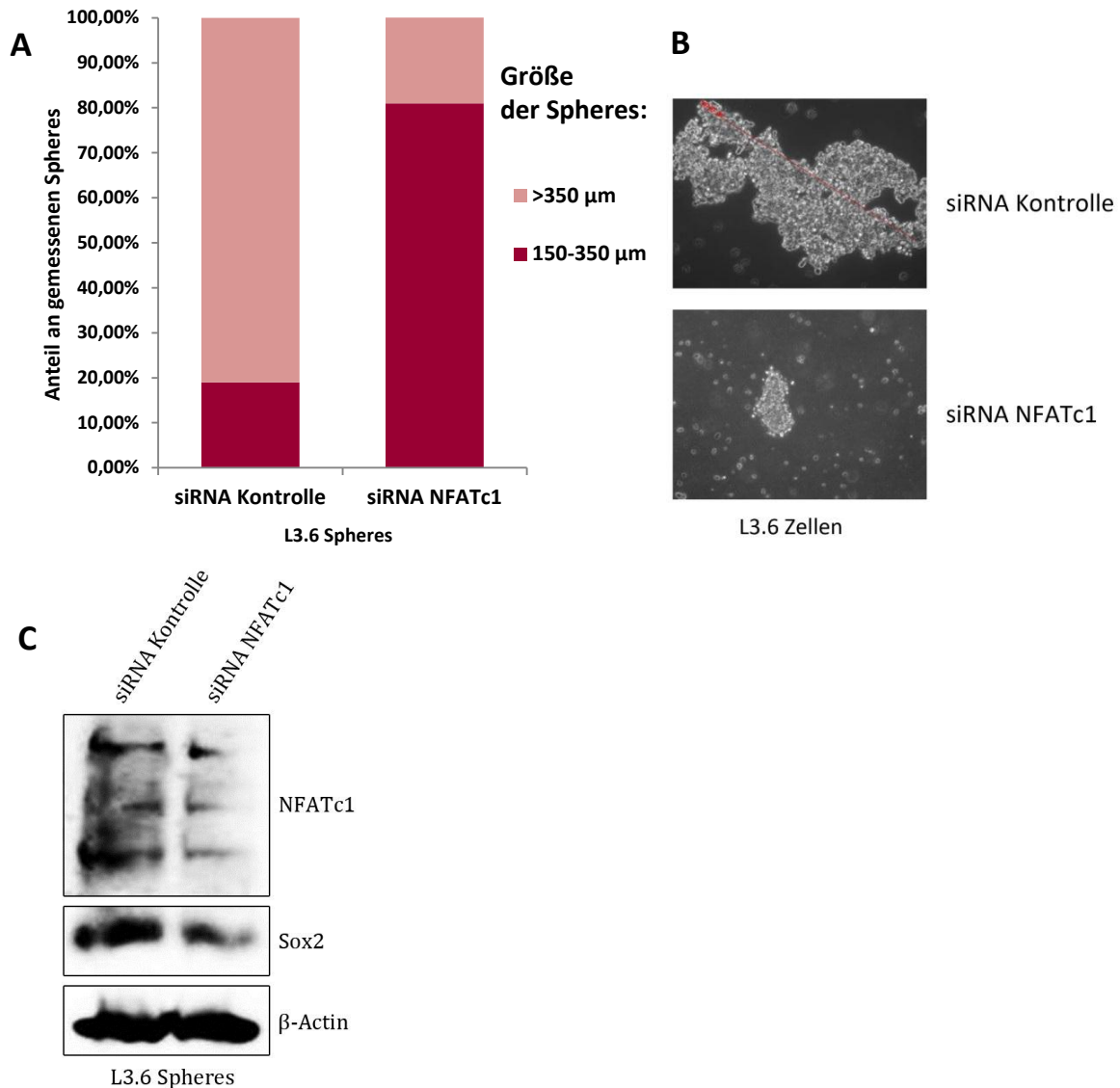


Abb. 44: Der Einfluss der genetischen Depletion von NFATc1 auf die Sphere-Formation und die Proteinexpression von NFATc1 und Sox2 in L3.6 Zellen. L3.6 Zellen wurden mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect*TM behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf Corning Platten überführt und nach weiteren 48 Stunden wurden die Durchmesser der Spheres gemessen. Abbildung (A) demonstriert die prozentuale Größenverteilung der jeweils 21 gemessenen Spheres. Abbildung (B) zeigt beispielhaft Spheres beider Gruppen. (C) Zudem wurde Gesamtzelllysat gewonnen und mittels Western Blot die Expression von NFATc1 und Sox2 in den Spheres untersucht. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Um zu determinieren, ob die Wirkung von NFATc1 auf die Bildung von Spheres durch Sox2 vermittelt wird, wurde der Effekt der genetischen Depletion des Stammzellmarkers Sox2 in KNPC 001 Zellen auf die Bildung von Spheres untersucht. Die genetische Depletion von Sox2 führte zu einer stark eingeschränkten Sphere-Formation (Abb. 45).

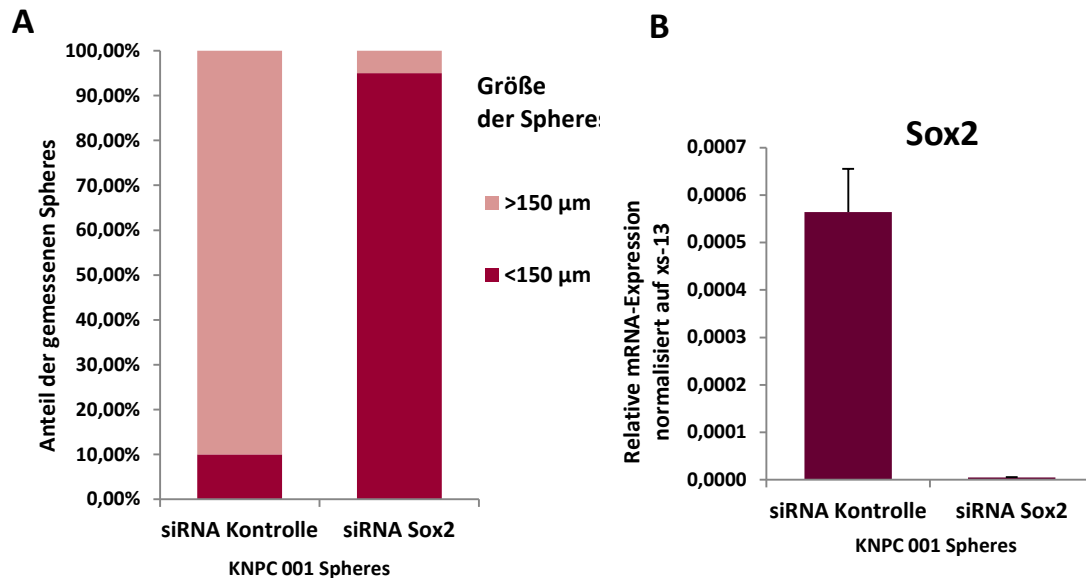


Abb. 45: Der Einfluss der genetischen Depletion von Sox2 auf die Sphere-Formation in KNPC 001 Zellen. KNPC 001 Zellen wurden mit gegen Sox2 gerichteter siRNA transfiziert bzw. in der Kontrollgruppe nur mit *siLentFect™* behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf Corning Platten überführt und nach weiteren 48 Stunden wurden die Durchmesser der Spheres gemessen. Abbildung (A) demonstriert die prozentuale Größenverteilung der jeweils 20 gemessenen Spheres. Abbildung (B) zeigt die Kontrolle des *knockdowns* von Sox2. Dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der auf das Referenzgen xs-13 normalisierten mRNA-Expression \pm SD.

5.7 Die Inhibierung von NFATc1 durch CsA führt zu verminderter Chemoresistenz von Tumorzellen

Neben der Fähigkeit zur Bildung von Spheres ist ein Merkmal von Tumorstammzellen die Vermittlung von Chemoresistenz. Eine mögliche Methode um das Pankreaskarzinom gegenüber Chemotherapeutika zu sensitivieren, könnte daher die Hemmung der Stammzeleigenschaften sein. Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, lassen sich Stammzeleigenschaften durch genetische sowie pharmakologische Hemmung von NFATc1, dem Regulator von Stammzellfaktoren, inhibieren. Um zu determinieren, ob die Hemmung von NFATc1 einen Einfluss auf die Chemosensitivität von Tumorzellen hat, wurden BrdU-Assays durchgeführt. Es wurde untersucht, ob die Kombination aus CsA und dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabine einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von Tumorzellen hat, als die Behandlung mit Gemcitabine alleine. Als Kontrolle diente die Behandlung mit CsA alleine sowie eine Gruppe ohne Behandlung.

In KNPC 001 Zellen hatte die Behandlung mit CsA und Gemcitabine in Kombination einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Proliferation als die Behandlung mit Gemcitabine alleine. Die Kombinationsbehandlung führte zu einer hoch signifikant geringeren Proliferation um 27 % gegenüber der Behandlung mit Gemcitabine alleine (Abb. 46). In der humanen Zelllinie L3.6 führte die Kombinationsbehandlung mit CsA und Gemcitabine zu einem Rückgang um über 96 % gegenüber der Kontrolle, während die Behandlung mit Gemcitabine zu einem Rückgang der Proliferation um 30 % gegenüber der Kontrolle führte. Beide Ergebnisse waren höchst signifikant. Die Behandlung mit CsA führte zu einem signifikanten Rückgang der Proliferation um 23 % gegenüber der Kontrolle (Abb. 47). In der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PDAC 10/11/11 hatte die Einzelbehandlung mit CsA bzw. Gemcitabine keinen Effekt auf die Proliferation, jedoch führte die Kombination aus CsA und Gemcitabine zu einer signifikant geringeren Proliferation gegenüber Kontrolle, CsA und Gemcitabine alleine (Abb. 48).

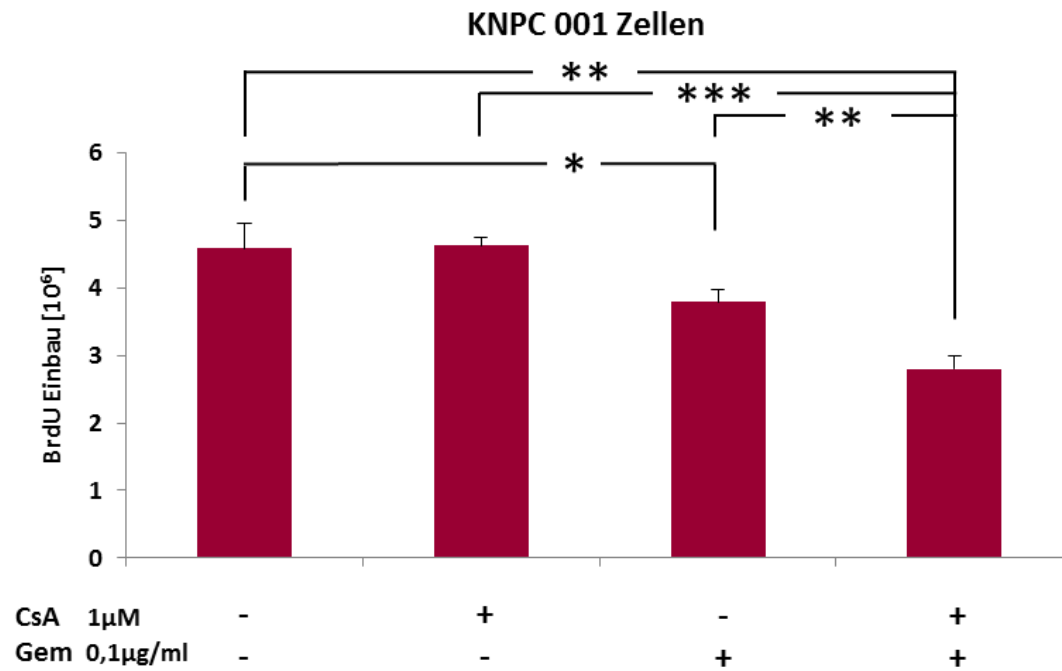


Abb. 46: Auswirkung von CsA und Gemcitabine auf die Proliferation von KNPC 001 Zellen. KNPC 001 Zellen wurden mit 1 µM CsA und/oder 0.1 µg/ml Gemcitabine behandelt. Als Kontrolle wurde H₂O verwendet. Nach 24 Stunden wurde der BrdU-Einbau ermittelt. Das Schaubild zeigt die Mittelwerte der Vierfachbestimmung des BrdU-Einbaus $\times 10^6 \pm$ SD.

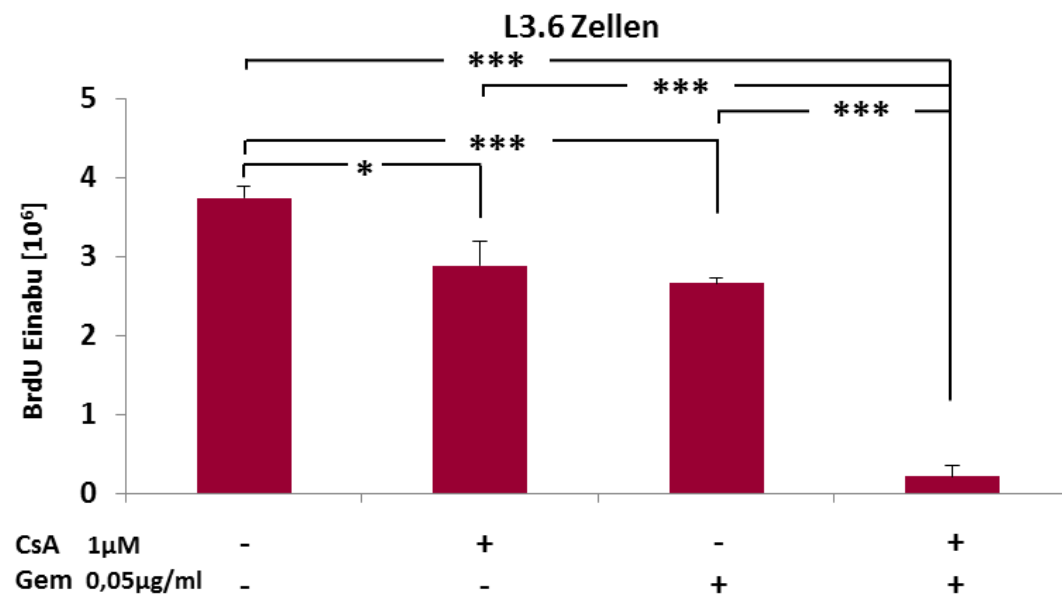


Abb. 47: Auswirkung von CsA und Gemcitabine auf die Proliferation von L3.6 Zellen. L3.6 Zellen wurden mit 1 µM CsA und/oder 0.05 µg/ml Gemcitabine behandelt. Als Kontrolle wurde H₂O verwendet. Nach 24 Stunden wurde der BrdU-Einbau ermittelt. Das Schaubild zeigt die Mittelwerte der Vierfachbestimmung des BrdU-Einbaus $\times 10^6 \pm$ SD.

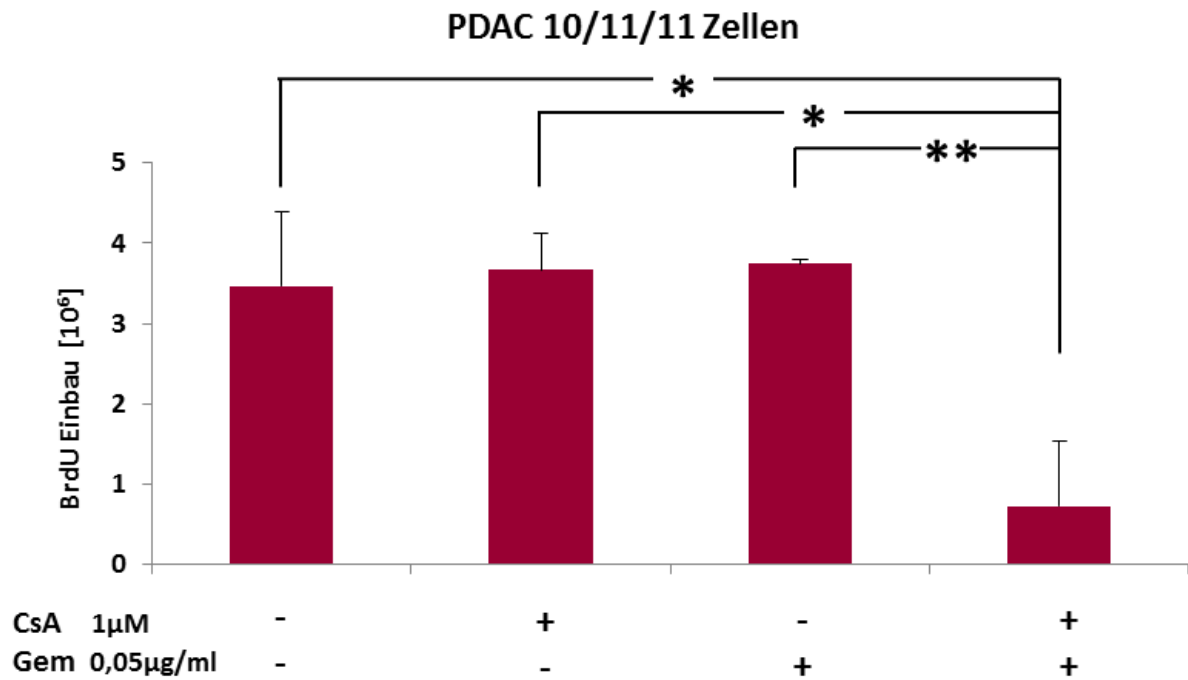


Abb. 48: Auswirkung von CsA und Gemcitabine auf die Proliferation von PDAC 10/11/11 Zellen. PDAC 10/11/11 Zellen wurden mit 1 μM CsA und/oder 0.05 μg/ml Gemcitabine behandelt. Als Kontrolle wurde H₂O verwendet. Nach 24 Stunden wurde der BrdU-Einbau ermittelt. Das Schaubild zeigt die Mittelwerte der Vierfachbestimmung des BrdU-Einbaus $\times 10^6 \pm \text{SD}$.

Zusammenfassend zeigen diese Daten eine Verstärkung der antiproliferativen Wirkung von Gemcitabine bei simultaner Hemmung von NFATc1 durch CsA.

6 Diskussion

6.1 Der Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 ist mit einem entdifferenzierten Phänotyp des Pankreaskarzinoms assoziiert

Der Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 wurde in der Vergangenheit bereits mit einem aggressiven und entdifferenzierten Phänotyp des Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht (Spike und Wahl 2011). In Arbeiten der AG Ellenrieder zeigten in einer Reihe von 161 humanen NFATc1-positiven Pankreaskarzinomproben 59,4 % der schlecht differenzierten, aber nur 31,4 % der gut bis mäßig differenzierten Tumore eine nukleäre Expression von p53 (Abb. 49). Gensequenzanalysen zeigten eine starke Korrelation zwischen nukleärer Expression von p53 und Mutation des *TP53*-Gens, hierbei vorrangig *hotspot*-Mutationen (Singh *et al.* 2015).

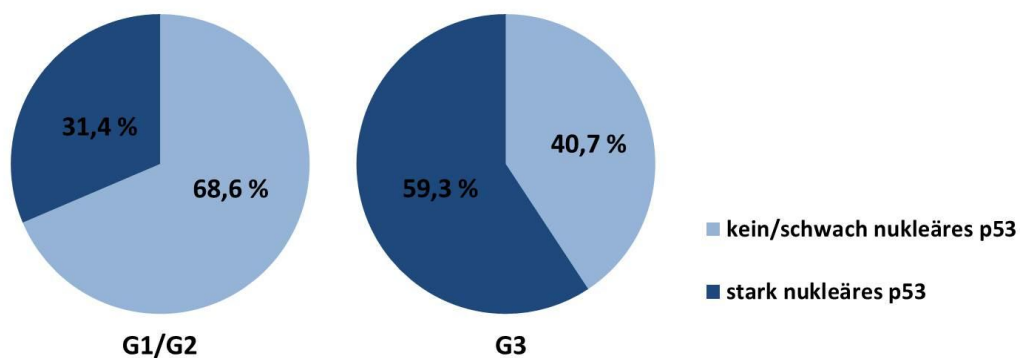


Abb. 49: Anteil nukleärer Expression von p53 in humanen Pankreaskarzinomen. (Modifiziert nach Singh *et al.* 2015). Prozentualer Anteil der nukleären Expression von p53 in 161 NFATc1-positiven humanen Pankreaskarzinomen unterschiedlicher Differenzierung. Starke nukleäre Expression von p53 wurde in 31,4 % der G1/G2-Tumore und in 59,3 % der G3-Tumore registriert.

Dieser Sachverhalt wurde mittels transgener Mausmodelle eingehend untersucht. In transgenen Mäusen mit konstitutiver Aktivierung von NFATc1 und onkogener Mutation von *Kras* (NKC-Mäusen) wurde im fortgeschrittenen Adenokarzinom des Pankreas ein Verlust des Tumorsuppressors p53 beobachtet (Singh *et al.* 2015). Immunhistochemisch äußert sich dieser Funktionsverlust von p53 nicht, wie bei vielen Mutationen des *TP53*-Gens zu erwarten wäre, als nukleäre Akkumulation, sondern als vollständiger Expressionsverlust (Abb. 50).

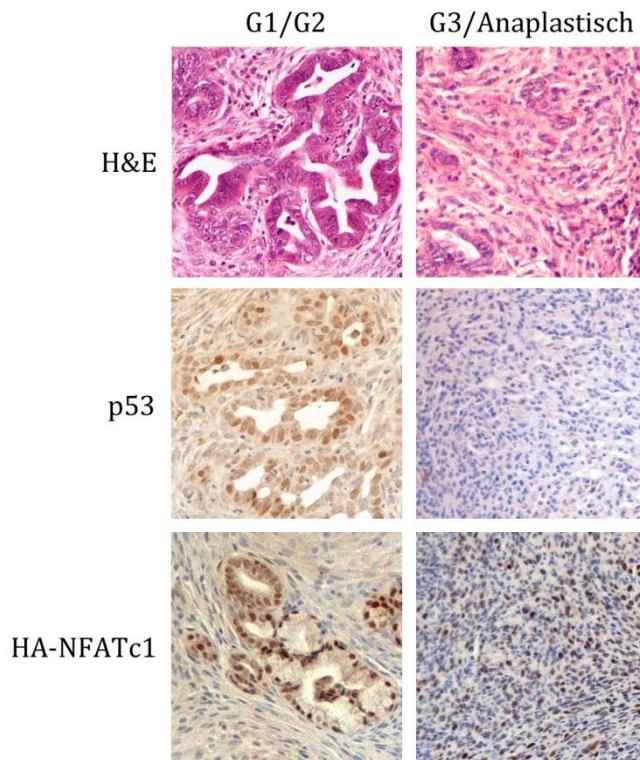


Abb. 50: Immunhistochemische Analyse der Expression von p53 und HA-NFATc1 in unterschiedlich differenzierten NKC-Pankreastumoren. Humane Pankreasschnitte wurden mit HE gefärbt, bzw. mit p53 und HA-NFATc1 Antikörpern inkubiert und mit DAB visualisiert. Gezeigt sind Ausschnitte in 20facher Vergrößerung.

Durch Genomsequenzierung wurde weder eine Mutation von p53 noch der genetische Verlust festgestellt (nicht publizierte Daten der AG Ellenrieder). Auch auf Proteinebene ist eine verminderte Expression von p53 zu beobachten (Abb. 16A). Zu erklären ist dieser Expressionsverlust von p53 durch zwei unterschiedliche Hypothesen: Zum einen könnte das komplexe Regulationsnetzwerk von p53 zu einem verstärkten Abbau des Proteins führen, zum anderen könnten epigenetische Regulationsmechanismen, die im fortgeschrittenen Pankreaskarzinom mit onkogener Kras-Mutation sowie aktiviertem NFATc1 induziert werden, zu einer verminderten Transkription von p53 führen. Der Mechanismus, der dem Verlust von p53 zugrunde liegt, wurde in dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht, allerdings wurde beobachtet, dass der Verlust der tumorsuppressiven Funktion von p53 zu einem entdifferenzierten Phänotyp des Pankreaskarzinoms führt, was in Abb. 8 dargestellt ist.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde ein weiteres transgenes Mausmodell generiert, das neben der konstitutiven Aktivierung von NFATc1 und onkogener

Mutation von *Kras* eine heterozygote *Trp53^{R172H}*-Mutation aufweist, welche analog zu der im humanen Pankreaskarzinom häufig vorkommenden Mutation *TP53^{R175H}* ist und zu einem Funktionsverlust der tumorsuppressiven Funktion von p53 führt. Diese KNPC-Mauslinie zeigte einen stark aggressiven und entdifferenzierten Phänotyp mit einer medianen Überlebensdauer von nur 50 Tagen und einem Differenzierungsgrad von G3 oder schlechter in 100 % der Fälle (Abb. 51) (Singh *et al.* 2015).

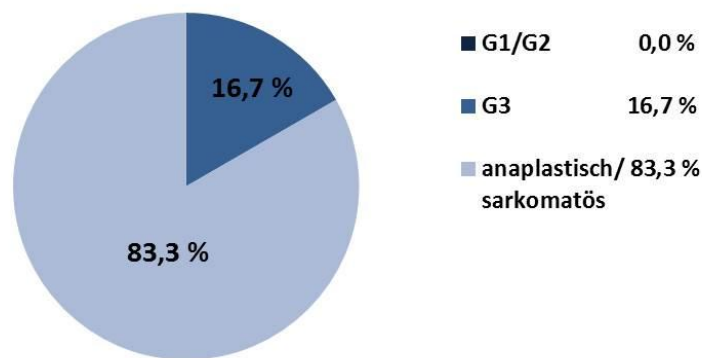


Abb. 51: Prozentuale Verteilung der Differenzierungsgrade von KNPC-Tumoren. (Modifiziert nach Singh *et al.* 2015). HE-gefärbte Schnitte wurden anhand der WHO-Kriterien für das Pankreaskarzinom in die Differenzierungsgrade G1, G2, G3 und anaplastisch/sarkomatös eingeteilt. 16,7 % der Areale entsprachen dem Differenzierungsgrad G3 und 83,3 % waren anaplastische bzw. sarkomatöse Areale. Kein Areal entsprach überwiegend dem Differenzierungsgrad G1 oder G2.

Es gibt Hinweise darauf, dass Mutationen von p53 nicht nur durch den Verlust dessen tumorsupprimierender Wirkung, sondern auch durch onkogene Effekte des mutierten Proteins zur Karzinogenese beitragen. Mutiertes p53 transaktiviert beispielsweise den Promotor des Protoonkogens c-Myc und steigert somit dessen Expression (Frazier *et al.* 1998). Neben seiner Funktion als Master-Transkriptionsfaktor in der G1-Progression spielt c-Myc auch eine Rolle in stammzellähnlichen Tumorzellen des Pankreaskarzinoms (Wang *et al.* 2013). Effekte der p53-Mutation auf die Entdifferenzierung des Pankreaskarzinoms könnten also auch durch c-Myc und andere Signalwege *downstream* von mutiertem p53 erklärt werden. Die hier untersuchte *Trp53^{R172H}*-Mutation, welche der Mutation im Codon 175 im menschlichen *TP53*-Gen entspricht, und als eine der sechs *hotspot*-Mutationen im Pankreaskarzinom gilt, hat erwiesenermaßen onkogene *gain-of-function*-Effekte (Olive *et al.* 2004). Um zu evaluieren, ob neben dem Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 auch onkogene Effekte der

Trp53^{R172H}-Mutante zum Phänotyp der KNPC-Mauslinie beitragen, wurde ein weiteres transgenes Mausmodell untersucht: die *KNP^{+/-}C*-Maus, welche anstatt der *Trp53^{R172H}*-Mutation eine heterozygote genetische Depletion von p53 trug. Die Betrachtung dieses Mausmodells macht deutlich, dass der genetische Verlust von p53 ebenfalls zu einem aggressiven und entdifferenzierten Adenokarzinom des Pankreas führt. Diese Mäuse zeigten eine deutlich verminderte mediane Überlebensdauer im Vergleich zu der Mauslinie NKC. Allerdings war die mediane Überlebensdauer der Mauslinie mit genetischer Depletion von p53 mit 63 Tagen um 13 Tage länger als die der Mauslinie mit *Trp53^{R172H}*-Mutation, was möglicherweise durch onkogene Effekte der p53-Mutation zu erklären ist. Die Kaplan-Meyer-Überlebenskurven aller drei Mauslinien sind in Abb. 52 dargestellt.

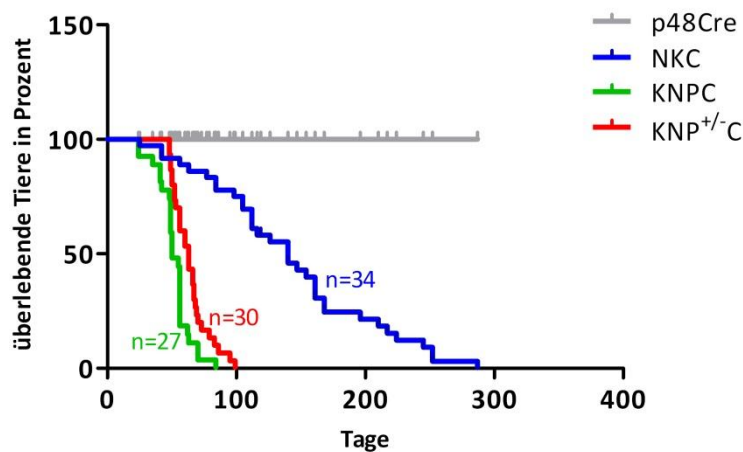


Abb. 52: Kaplan-Meyer-Kurven zum Vergleich der Überlebensdauer der Mauslinien NKC, KNPC, *KNP^{+/-}C* und p48-Cre. (Dissertation Nadine Völker, voraussichtlich 2016) Die Anzahl der überlebenden Tiere (in Prozent) wurde gegen die Überlebensdauer (in Tagen) aufgetragen. Die längste mediane Überlebensdauer hat nach der p48-Cre-Mauslinie (grau) die Mauslinie NKC mit 140 Tagen (blau), gefolgt von der Mauslinie *KNP^{+/-}C* mit 63 Tagen (rot) und der Mauslinie KNPC mit 50 Tagen (grün).

Betrachtet man die Differenzierungsgrade beider Mauslinien, fällt auf, dass die Pankreaskarzinome einen stark entdifferenzierten Phänotyp zeigen, wobei Tumore der *KNP^{+/-}C*-Maus etwas besser differenziert waren als Tumore der KNPC-Maus mit *Trp53^{R172H}*-Mutation. Tumore der KNPC-Mäuse hatten mit 83 % einen deutlich größeren Anteil anaplastischer Tumore im Vergleich zu Tumoren der *KNP^{+/-}C*-Maus mit genetischer Depletion von p53 (Abb. 15, Abb. 51). Diese Unterschiede sind möglicherweise durch Aktivierung onkogener Signalwege aufgrund der *Trp53^{R172H}*-Mutation zu erklären.

6.2 Der Tumorsuppressor p53 reprimiert Stammzellfaktoren durch microRNAs

Die Mechanismen, die dem differenzierungshemmenden Effekt von p53 zugrunde liegen, sind bisher nur teilweise verstanden und konnten in dieser Arbeit weitergehend nachvollzogen werden. Wie auch eine Studie von Pinho und Kollegen zeigte, ist in dieser Arbeit der Verlust von p53 mit einem Anstieg von Stammzellfaktoren vergesellschaftet (Pinho *et al.* 2011). Dies konnte durch DNA-Microarray mit anschließender GSEA-Analyse sowie auf mRNA- und Proteinebene sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestätigt werden (Abb. 16 – Abb. 22). Weitere Experimente im Rahmen dieser Arbeit deckten einen direkten Zusammenhang der Inaktivierung von p53 mit einem Verlust von miRNAs und dem konsekutiven Anstieg von Stammzellfaktoren sowie der Zunahme von Stammzelleigenschaften im Pankreaskarzinom auf. Die in dieser Arbeit untersuchten microRNAs 34a und 200c wurden bereits häufig im Zusammenhang mit p53 beschrieben. In einer Studie von Chang und Kollegen im Jahr 2007 zeigten normale Pankreaszellen mit Wildtyp-p53 eine zweifach höhere Expression von miR-34a als Pankreastumorzellen. miR-34a wurde hier vor allem als Inhibitor des Zellzyklus beschrieben (Chang *et al.* 2007). Einige Studien bringen miR-34a mit der Inhibition von stammzellähnlichen Tumorzellen in Verbindung (Ji *et al.* 2009). In Prostata-tumorzellen wurde nach Verlust von miR-34a ein Wegfall des hemmenden Effekts auf den Stammzellmarker CD44 beschrieben, außerdem besteht im Pankreaskarzinom eine negative Regulierung einiger EMT-Regulatoren sowie der Notch-Familie durch miR-34a (Liu *et al.* 2011; Nalls *et al.* 2011). Eine Bestätigung dieser Ergebnisse war durch die hier vorliegende Arbeit nicht möglich. Zwar wurde die Regulation von miR-34a durch p53 im Pankreas bestätigt, jedoch waren Ergebnisse bezüglich einer Regulation der Stammzellfaktoren durch miR-34a nicht überzeugend (Abb. 23 – Abb. 26). Die microRNA-200c hat in dieser Arbeit hingegen deutliche inhibitorische Effekte auf die Stammzellfaktoren Sox2, Klf4 und Bmi1 (Abb. 23 – Abb. 29). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit aktuellen Studien: Chang und Mitarbeiter demonstrierten im Jahr 2011 eine direkte Regulation von miR-200c durch p53. Der Verlust von miRNA-200c durch Inaktivierung von p53 im Mammakarzinom führte zu einem Anstieg von Stammzellfaktoren (Chang *et al.* 2011). Eine weitere Studie von Wellner und Kollegen im Jahr 2009 demonstrierte

die Inhibition der Expression von Sox2, Klf4 und Bmi1 durch miR-200c im Pankreaskarzinom (Wellner *et al.* 2009). Diese beiden Beobachtungen wurden in der hier vorliegenden Arbeit verknüpft. Die Beobachtung, dass der Verlust von p53 im Mammakarzinom mit einer verminderten Expression von miR-200c einhergeht, wurde in dieser Arbeit auf das Pankreaskarzinom ausgeweitet. Zugleich konnten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Wellner bestätigt werden: Es wurde eine verminderte Expression der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4 und Bmi1 nach Überexpression von miR-200c nachgewiesen. Ob und wie p53 miRNA-200c direkt reguliert, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Möglich wäre die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an den miR-200c Promotor, wie es im Mammakarzinom der Fall ist (Chang *et al.* 2011). Wellner und Kollegen beschrieben außerdem eine regulatorische Schleife, bei der sich miR-200c und der EMT-Regulator Zeb1 gegenseitig kontrollieren und somit die Wirkung von miR-200c auf Stammzellfaktoren durch Zeb1 verstärkt wird (Wellner *et al.* 2009). In der hier vorliegenden Arbeit wurde zudem eine verminderte Sphere-Formation nach Überexpression von miR-200c beobachtet, was auf eine relevante Reprimierung von Stammzeleigenschaften durch miR-200c hindeutet (Abb. 29). Abb. 53 gibt einen Überblick über die p53-vermittelte Regulation von Stammzellfaktoren durch intaktes p53.

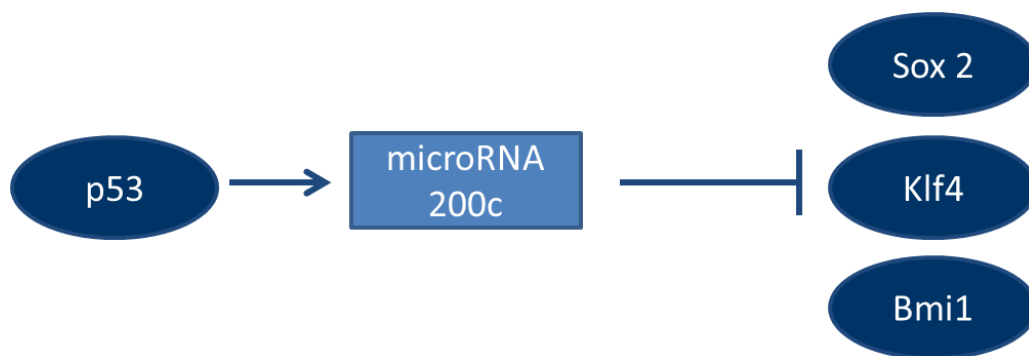


Abb. 53: Regulation der Expression von Sox2, Klf4 und Bmi1 durch die p53-getriggerte Inhibition mittels miRNA-200c bei intaktem p53. Aktives p53 hemmt die Expression der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4 und Bmi1 mithilfe der inhibitorischen miR-200c. Der Verlust von p53 im Pankreaskarzinom führt zu verminderter Expression von miR-200c und somit zum Anstieg der Expression von Stammzellfaktoren im Pankreaskarzinom.

6.3 NFATc1 fördert Entdifferenzierung durch Expression von Stammzellfaktoren

Die AG Ellenrieder konnte beobachten, dass die konstitutive Aktivierung von NFATc1 zu einer stark akzelerierten Karzinogenese bei transgenen Mäusen führt, die zudem eine onkogene *Kras*-Mutation tragen. Tumore dieser NKC-Mäuse zeigten – je nach p53-Status – eine große Bandbreite von Differenzierungsgraden bis hin zu anaplastischen Tumoren (Abb. 7). Inwiefern NFATc1 an der Entstehung dieses entdifferenzierten Phänotyps beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit eingehend untersucht. Hinweise auf einen möglichen Effekt von NFATc1 auf den Differenzierungsgrad des Pankreaskarzinoms liefert die Betrachtung des etablierten transgenen Mausmodells KPC, welches eine *Kras*^{G12D}-Mutation mit einer *Trp53*^{R172H}-Mutation pankreasspezifisch kombiniert. In einer Studie von Hingorani und Kollegen waren 88 % der Pankreastumore dieser KPC-Mäuse gut bis mäßig differenziert (Hingorani *et al.* 2005). Die AG Ellenrieder stellte einen starken Zusammenhang des Differenzierungsgrades und der nukleären Expression von NFATc1 in KPC-Tumoren fest. Hierbei waren 70 % der schlecht differenzierten, aber nur 18,7 % der gut bis mäßig differenzierten Tumore NFATc1-positiv (Abb. 54).

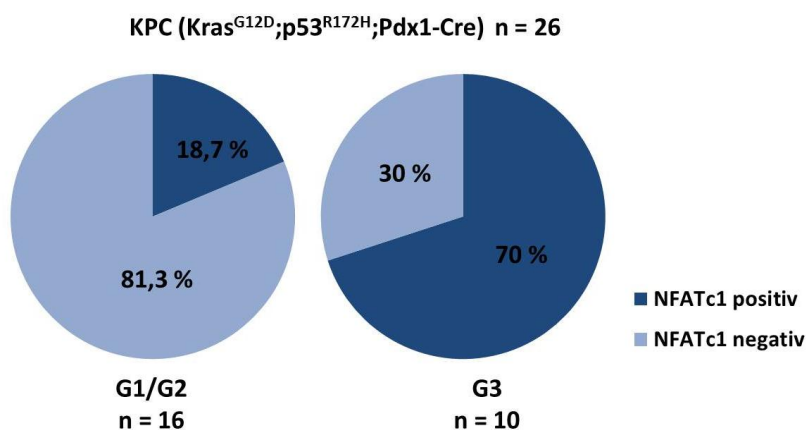


Abb. 54: Prozentualer Anteil NFATc1-positiver Tumore in KPC (*Kras*^{G12D}; *p53*^{R172H}; *Pdx1-Cre*)-Tumoren unterschiedlicher Differenzierung (Modifiziert nach Singh *et al.* 2015). 26 KPC-Tumore wurde zunächst nach Differenzierungsgrad in G1/G2 (gut bis mäßig differenziert, n = 16) und G3 (schlecht differenziert, n = 10) eingeteilt und anschließend immunhistochemisch auf die nukleäre Expression von NFATc1 untersucht. Nur 18,7 % der G1/G2-Tumore, aber 70 % der G3-Tumore waren NFATc1-positiv.

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus untersucht, durch welchen NFATc1 zu einem entdifferenzierten Phänotyp beiträgt. Zunächst ist in murinen Tumoren mit konstitutiv aktivem NFATc1 (KNPC und KNP^{+/-}C) die Expression der Stammzellfaktoren sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene im Vergleich zu ihrer Expression in KPC-Tumoren erhöht (Abb. 30, Abb. 31). Die daraufhin vermutete Regulation der Stammzellfaktoren durch NFATc1 wurde durch eine Vielzahl an Experimenten bestätigt. So führte die pharmakologische wie genetische Inhibition von NFATc1 durchgehend in einer Reihe unterschiedlicher muriner sowie humaner Zelllinien zu einer verminderten Expression von Stammzellfaktoren auf mRNA- wie Proteinebene (Abb. 32 – Abb. 37). Dies lässt darauf schließen, dass NFATc1 die Induktion der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 im Pankreaskarzinom fördert, was in Abb. 55 schematisch dargestellt ist.

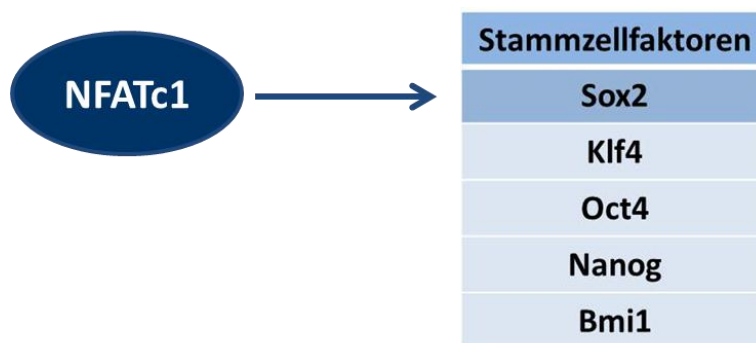


Abb. 55: NFATc1 steigert die Expression der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1

Diese Beobachtung steht im Kontrast zu der Tatsache, dass NFATc1 in der Embryogenese ein wichtiger Regulator der Differenzierung ist. (Chang *et al.* 2004; Graef *et al.* 2001; Friday *et al.* 2000; Mammucari *et al.* 2005). Umstände, die determinieren, ob NFATc1 Differenzierung fördert oder hemmt, werden derzeit von der Arbeitsgruppe Ellenrieder untersucht. Vermutlich hängt es von der Aktivität anderer Signalwege sowie seiner Partnerproteine ab, ob NFATc1 Gene reguliert, welche Differenzierung oder Entdifferenzierung vorantreiben. Eine Möglichkeit wäre hierbei die Anwesenheit einer onkogenen Kras-Mutation, was in 90 % der Pankreaskarzinome der Fall ist. Die AG Ellenrieder beobachtet eine klare Korrelation zwischen der NFATc1-abhängigen Induktion von Stammzellfaktoren und der Mutation von Kras, bzw. von Signalwegen *downstream* von Kras in

verschiedenen Zellsystemen (nicht publizierte Daten der AG Ellenrieder). Zudem könnte die Inaktivierung von p53 hier eine Rolle spielen.

Der Stammzellfaktor, der der Inhibition von NFATc1 am konstantesten mit einer verminderten Expression folgte, war der Transkriptionsfaktor Sox2. Da Sox2 auch durch andere Studien eine wichtige Rolle für die Entdifferenzierung des Pankreaskarzinoms zugeschrieben wird (Herrerros-Villanueva *et al.* 2013), wurde hier der Fokus auf die Regulation von Sox2 durch NFATc1 gelegt. NFATc1 reguliert seine Zielgene in der Regel als Transkriptionsfaktor durch Bindung an deren Promotor und/oder Enhancer (Rao *et al.* 1997). Mittels Chromatinimmunpräzipitation wurde die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors NFATc1 an Promotor sowie Enhancer von *SOX2* nachgewiesen (Abb. 38, Abb. 39). Zudem deutet die Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den *SOX2*-Enhancern, vor allem aber an dem *SOX2*-Promotor, auf eine Relevanz der NFATc1-Bindung für die transkriptionelle Aktivität hin. Zusammenfassend konnten diese Daten erstmals eine positive Regulation von Stammzellfaktoren durch NFATc1 nachweisen, welche im Falle von Sox2 durch direkte Bindung an dessen Promotor bzw. Enhancer gewährleistet wird. Abb. 56 zeigt ein Modell der Regulation von Sox2 durch NFATc1. Ob NFATc1 für die Transaktivierung des *SOX2*-Gens mit bestimmten Partnerproteinen kooperiert, wurde nicht weitergehend untersucht. Ein mögliches Partnerprotein wäre der onkogene Transkriptionsfaktor STAT3, welcher zum einen im Pankreaskarzinom regelhaft als Partnerprotein von NFATc1 fungiert und zum anderen durch mehrere Studien als wichtiger Regulator von Entdifferenzierung und EMT beschrieben wurde (Baumgart *et al.* 2014; Sherry *et al.* 2009; Lo *et al.* 2007).

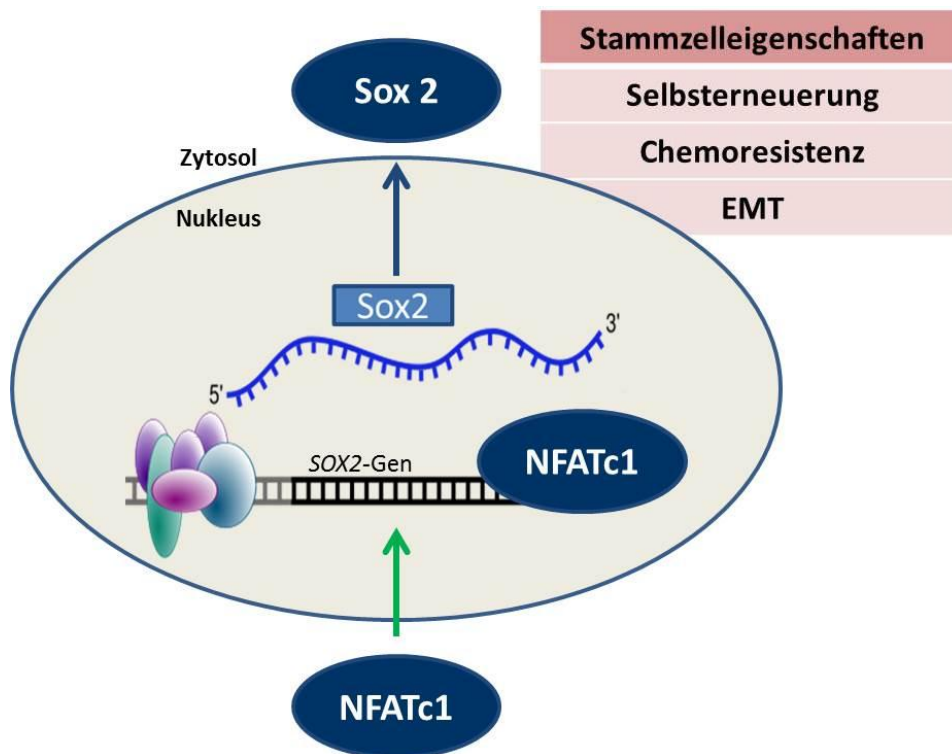


Abb. 56: Regulation von Sox2 durch NFATc1 als Transkriptionsfaktor. NFATc1 wird auf verschiedene Signale hin in den Zellkern befördert, wo es die Expression von Sox2 durch Bindung an dessen Enhancer/Promotor reguliert. Die Expressionssteigerung von Sox2 fördert Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung, Chemoresistenz und EMT (epithelial-mesenchymale-Transition).

6.4 Stammzellähnliche Tumorzellen im Pankreaskarzinom und deren Regulation durch NFATc1 und Sox2

Die Frage, ob stammzellähnliche Tumorzellen aus normalen Stammzellen oder aus differenzierten Tumorzellen entstehen, wurde in den vergangenen Jahren kontrovers diskutiert und ist tumorspezifisch zu untersuchen und zu beantworten. Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese nach welcher stammzellähnliche Tumorzellen durch Entdifferenzierung aus Tumorzellen entstehen. Die Induktion von Stammzellfaktoren war stets von einem Anstieg der EMT-Regulatoren Zeb1, Twist und Snail und dem mesenchymalen Marker Vimentin sowie einem gegenläufigen Expressionsverhalten des epithelialen Markers E-Cadherin begleitet. Interessanterweise konnte zudem auch eine positive Regulation der EMT-Faktoren durch den Stammzellregulator Sox2 beobachtet werden (Dissertation Nadine Völker, voraussichtlich 2016). Diese Ergebnisse

sprechen für einen direkten Zusammenhang zwischen der EMT und der Entstehung von Tumorzellen mit stammzellähnlichem Phänotyp. Auch die aktuelle Studienlage unterstützt das Modell, das auf der Entstehung von stammzellähnlichen Tumorzellen durch EMT beruht. Mehrere Studien stellten einen direkten Zusammenhang zwischen der EMT und einem stammzellähnlichen, mesenchymalen Phänotyp fest (Morel *et al.* 2008; Mani *et al.* 2008). Nach Induktion von EMT durch Reexpression der EMT-Regulatoren Twist oder Snail entstanden aus epithelialen Zellen der Brustdrüse Zellen mit dem Expressionsmuster $CD44^{\text{high}}/CD24^{\text{low}}$, welches als typisch für stammzellähnliche Zellen des Mammakarzinoms gilt (Mani *et al.* 2008). Außerdem ist die EMT mit der Expression von ALDH, einem Marker für stammzellähnliche Tumorzellen des Pankreaskarzinoms assoziiert (Rasheed *et al.* 2010). In Abb. 57 ist ein Modell zur Entstehung und Funktion von stammzellähnlichen Tumorzellen im Pankreaskarzinom dargestellt.

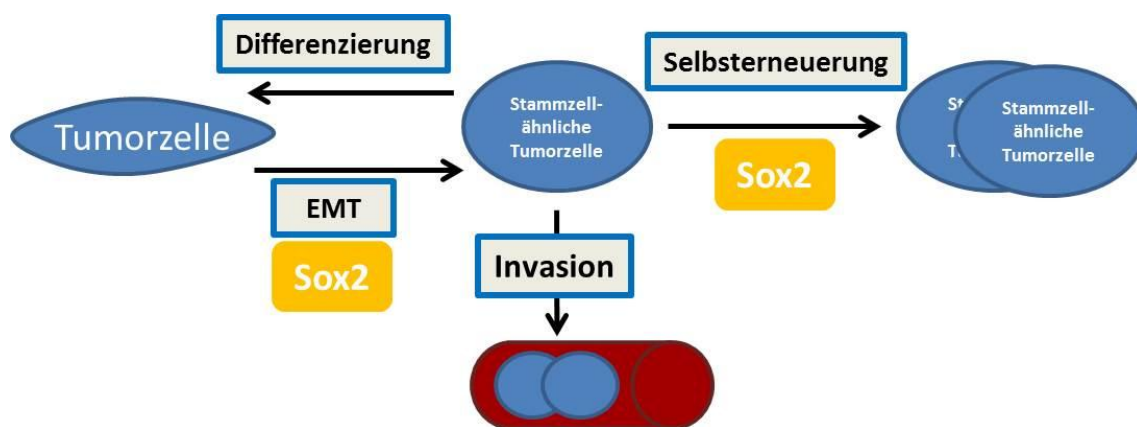


Abb. 57: Entstehung und Funktion von stammzellähnlichen Tumorzellen im Pankreaskarzinom und die Bedeutung von Sox2. Aus normalen Tumorzellen entstehen durch EMT Tumorzellen mit stammzellähnlichem Phänotyp. Diese Tumorzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in weitere Tumorzellen aus. Sox2 ist an der Regulation der EMT sowie an der Selbsterneuerung und der Aufrechterhaltung des stammzellähnlichen Phänotyps der Tumorzelle beteiligt. Stammzellähnliche Tumorzellen tragen außerdem zur Invasion und somit zur Metastasierung bei.

Zur Identifizierung von stammzellähnlichen Tumorzellen des Pankreaskarzinoms existiert derzeit kein einzelner zuverlässiger Marker. In einer Vielzahl von Studien wurden unterschiedliche Oberflächenmarker wie beispielsweise CD24, CD44, CD133, ESA, ALDH und CXCR4 zur Identifizierung von Tumorzellen mit

stammzellähnlichen Eigenschaften beschrieben (Castellanos *et al.* 2013; Li *et al.* 2007; Hermann *et al.* 2007; Rasheed *et al.* 2010; Tanase *et al.* 2014). Eine Methode, mit welcher Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften identifiziert werden können, ist neben der Durchflusszytometrie das Sphere-Assay (Li *et al.* 2015). In einer Studie von Hermann und Kollegen zeigten Tumorzellen des Pankreaskarzinoms mit positivem CD133 im Gegensatz zu CD133-negativen Tumorzellen eine gesteigerte Fähigkeit zur Bildung von Spheres und somit zur Selbsterneuerung. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die Bildung von Sphere-Formationen unter nicht-adhärenenten Bedingungen nur solchen Zellen des Pankreas vorbehalten ist, welche einen stammzellähnlichen Phänotyp aufweisen (Hermann *et al.* 2007). Dies macht das Sphere-Assay zu einer Methode, welche die weitergehende Untersuchung von stammzellähnlichen Tumorzellen des Pankreaskarzinoms ermöglicht. Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Stammzellfaktoren werden, genau wie NFATc1, verglichen mit epithelialen Zellen derselben Zelllinie, vermehrt in spherebildenden Zellen exprimiert (Abb. 40). Das bedeutet, dass NFATc1 und diese Stammzellfaktoren entweder zur Bildung von Spheres benötigt werden oder zumindest von spherebildenden und somit stammzellähnlichen Zellen vermehrt exprimiert werden. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss allerdings beachtet werden, dass in dem Medium zur Kultivierung von Spheres EGF (Epidermal growth factor) enthalten ist, welches über den EGF-Rezeptor die Expression von NFATc1 steigert (Chen *et al.* 2015). Da in dem Medium zur Kultivierung epithelialer Tumorzellen hingegen Kälberserum enthalten ist, welches seinerseits NFATc1 induzieren kann, könnten sich diese beiden Effekte aufheben (Furman *et al.* 2010). Durch Experimente, bei welchen Kontrolle sowie behandelte Gruppe unter denselben Bedingungen kultiviert wurden, konnte eine Verfälschung der Ergebnisse durch Inhaltsstoffe der Medien vermieden werden. Die pharmakologische oder genetische Inhibition von NFATc1 unter nicht-adhärenenten Bedingungen führte konsistent in einer Reihe verschiedener Zelllinien zu einer verminderten Bildung von Spheres, begleitet von einer reduzierten Expression der Stammzellfaktoren (Abb. 41 - Abb. 44). NFATc1 ist also für die Bildung von Spheres und somit für die Aufrechterhaltung eines stammzellähnlichen Phänotyps von entscheidender Bedeutung. Dies wirft die Frage auf, ob die NFATc1-vermittelte Induktion der Stammzellfaktoren oder andere Mechanismen *downstream* von NFATc1 diese stammzellähnliche

Eigenschaft fördert. Daher wurde die Sphere-Bildung nach genetischer Depletion von Sox2 untersucht. Nach genetischer Depletion von Sox2 zeigten die Tumorzellen ein vermindertes Potenzial zur Bildung von Spheres (Abb. 45). Dieser Sachverhalt wurde von Herreros-Villanueva und Kollegen eingehend untersucht. Diese beobachteten, dass in humanen Pankreaskarzinomzelllinien ein hohes Expressionsniveau von Sox2 mit einem verstärkten Potenzial zur Bildung von Spheres einhergeht. Zudem konnten sie zeigen, dass die gebildeten Spheres hohe Expressionslevel an pankreaskarzinomtypischen Stammzellmarkern aufwiesen. Die Expression dieser Marker war nach genetischer Depletion von Sox2 vermindert, begleitet von einem geringeren Potenzial zur Bildung von Spheres. Umgekehrt führte die Überexpression von Sox2 zu einer gesteigerten Fähigkeit zur Bildung von Spheres, einhergehend mit einem Anstieg der Tumorstammzellmarker (Herreros-Villanueva *et al.* 2013). Diese Daten weisen auf eine essenzielle Rolle von Sox2 in der Aufrechterhaltung eines stammzellähnlichen Phänotyps und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie der Bildung von Spheres hin. Der Transkriptionsfaktor Sox2 vermittelt also die Wirkung von NFATc1 auf die Stammzeleigenschaften des Pankreaskarzinoms.

6.5 Therapeutische Konsequenzen

Da die Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms häufig auf das Vorhandensein stammzellähnlicher Tumorzellen zurückzuführen ist, wurde angenommen, dass der Therapieerfolg durch die gezielte Hemmung von Regulatoren der Stammzeleigenschaften verbessert werden kann. NFATc1 wurde als wichtiges Molekül im Zusammenhang mit Chemoresistenz beschrieben (Murray *et al.* 2014). Wie in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, ist die Expression der Stammzellregulatoren Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 durch die Inhibition von NFATc1 reprimierbar. Für Sox2 wurde gezeigt, dass dessen Expressionsverlust mit einem Verlust von Stammzeleigenschaften der Zelle verbunden ist (Abb. 45) (Herreros-Villanueva *et al.* 2013). Dies führte zu der Hypothese, dass Sox2 durch die Aufrechterhaltung eines stammzellähnlichen Phänotyps der Zelle auch für Chemoresistenz verantwortlich ist. Ob die Inhibition von NFATc1 und konsekutiv von Sox2 eine Reduktion der Chemoresistenz zur Folge hat, wurde durch Proliferationsassays untersucht. Durch CsA-vermittelte Hemmung von NFATc1 sollten die Tumorzellen gegenüber dem Standardchemotherapeutikum

Gemcitabine sensitiviert werden. Durch Ermittlung der Proliferationsrate wurde das Ansprechen der Tumorzellen auf Gemcitabine untersucht. Die Hemmung von NFATc1 durch CsA ohne parallele zytostatische Behandlung hatte nur geringe Effekte auf die Proliferation, welche durch die NFATc1-vermittelte Regulation von c-Myc sowie verschiedener zellzyklusregulierender Gene erklärt werden können (Koenig *et al.* 2010b). Die Monotherapie mit Gemcitabine führte zwar zu einer verminderten Proliferation gegenüber der Kontrolle, jedoch weniger stark und signifikant als nach Kombinationstherapie. Die Kombinationstherapie mit CsA und Gemcitabine führte zu einer höchstsignifikanten Reduktion der Proliferation um bis zu 80 % im Vergleich zur Behandlung mit Gemcitabine alleine (Abb. 46 - Abb. 48). Dies deutet auf eine starke Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Gemcitabine mithilfe der CsA-vermittelten Hemmung von NFATc1 und damit von Stammzellfaktoren hin. Inwiefern diese Ergebnisse auch *in vivo* zu erzielen wären, ist unklar. Da die Hemmung von NFAT auch zu einer Suppression des Immunsystems führt, könnte der Wegfall der immunvermittelten Tumorsuppression auch zu gegenteiligen Ergebnissen führen. Aufgrund der vielfältigen Nebenwirkungen von CsA, die durch die NFAT-unabhängigen Folgen der Calcineurin-Hemmung zustande kommen, wurden in den vergangenen Jahren selektivere NFAT-Inhibitoren entwickelt. Das Peptid VIVIT blockiert selektiv die Interaktion von Calcineurin mit NFAT, aufgrund seiner Instabilität ist es allerdings schwierig zu handhaben. Weitere CsA- oder FK506-Analoga wie ISATX47 und L-732531 haben zwar ein geringeres NFAT-unabhängiges Nebenwirkungsprofil, die NFAT-vermittelten Nebenwirkungen, allen voran die Immunsuppression lassen sich allerdings auch hier nicht verhindern (Mancini und Toker 2009). Um diese Nebenwirkungen vollständig zu vermeiden, wären Substanzen notwendig, welche Sox2 oder andere Stammzellfaktoren sowie EMT-Regulatoren direkt angreifen. Hierbei wäre wiederum der Einsatz von microRNAs denkbar. In verschiedenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Chemoresistenz von Pankreaskarzinomzellen gegenüber Gemcitabine und einer verminderten Expression von miRNAs-200 festgestellt (Garajová *et al.* 2014). Nach Reexpression von miRNA-200 zeigten Pankreastumorzellen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Gemcitabine. Die Reexpression von miRNAs in Tumorzellen wurde mithilfe der Naturstoffe DIM (3,3'-Diindolylmethan), Isoflavon, Curcumin und dessen Analogon CDF erreicht. Dies führte zu einem epithelialen Phänotyp sowie

zu einer leichten Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Gemcitabine (Li *et al.* 2009; Ali *et al.* 2010). Derzeit werden weitere Möglichkeiten zur Reexpression von microRNA *in vivo* mithilfe von Liposomen oder Nanovektoren erforscht (Srivastava *et al.* 2014; Hu *et al.* 2013). Die erste klinische Studie, bei der zur Reexpression der miRNA-34 im hepatozellulären Karzinom und anderen ausgewählten soliden Tumoren die Liposomen-basierte miR-34-Mimic MRX34 eingesetzt wird, befindet sich derzeit in Phase I (Rachagani *et al.* 2015). Für klinische Studien zur Therapie des Pankreaskarzinoms durch gezieltes Ausschalten von stammzellähnlichen Tumorzellen sollte das Maß für die Effizienz der Therapie überdacht werden. Aktuell ist das Maß für eine erfolgreiche Therapie die Reduktion der Tumormasse. Da die stammzellähnlichen Tumorzellen weniger als 5 % der Tumormasse ausmachen, wird hier ein neuer Indikator benötigt, um den Erfolg einer Chemotherapie festzustellen (Wang *et al.* 2013).

6.6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren erstmals eine gegenläufige Regulation von Stammzellfaktoren durch den Transkriptionsfaktor NFATc1 und den Tumorsuppressor p53 im Pankreaskarzinom. Der inhibitorische Effekt auf Stammzellfaktoren wird von intaktem p53 durch microRNA-200c vermittelt. Nach Inaktivierung der tumorsuppressiven Aktivität von p53, was im Pankreaskarzinom durch verschiedene Mechanismen erfolgen kann, führt die transkriptionelle Aktivität von NFATc1 zu einer Expressionssteigerung von Sox2 und anderen Stammzellregulatoren. Diese Stammzellregulatoren unterstützen stammzellähnliche Tumorzellen in ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und tragen zur Chemoresistenz bei. Durch die Erforschung der Regulationsmechanismen der Stammzellfaktoren in dieser Arbeit ergeben sich neue Therapieansätze zur Eliminierung von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften.

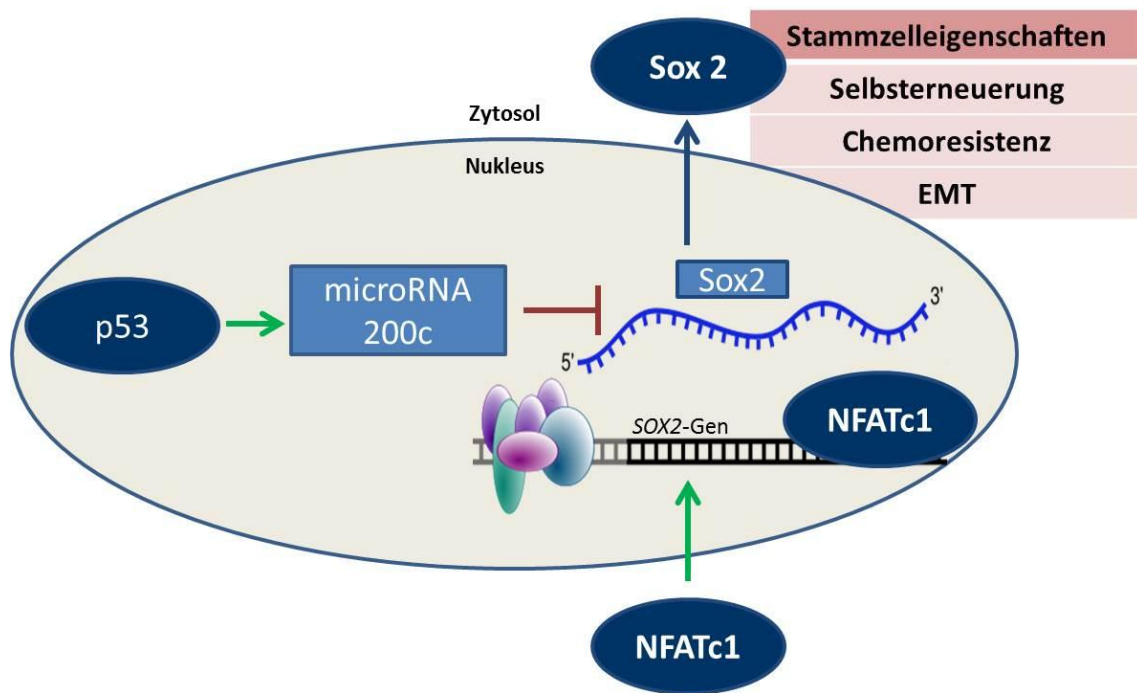


Abb. 58: Gegenläufige Regulation des Stammzellfaktors Sox2 durch den Transkriptionsfaktor NFATc1 und den Tumorsuppressor p53. Der inhibitorische Effekt auf Stammzellregulatoren wird von intaktem p53 durch microRNA-200c vermittelt, welche Sox2 auf mRNA-Ebene reprimiert. Nach Verlust von p53 im Pankreaskarzinom führt die Bindung von nukleärem NFATc1 an den Enhancer/Promotor von *SOX2* zu dessen Expressionssteigerung. Sox2 fördert Stammzelleigenschaften wie Selbsterneuerung, Chemoresistenz und EMT.

7 Literaturverzeichnis

Abel EV, Kim EJ, Wu J, *et al.* The notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer. *PloS one* 2014;9:e91983.

Ali S, Ahmad A, Banerjee S, *et al.* Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF. *Cancer research* 2010;70:3606-17.

Andea A, Sarkar F, Adsay VN. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2003;16:996-1006.

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science (New York, NY)* 2008;321:699-702.

Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *The Journal of pathology* 1994;172:5-12.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-33.

Basu-Roy U, Seo E, Ramanathapuram L, *et al.* Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene* 2012;31:2270-82.

Baumgart S, Chen NM, Siveke JT, *et al.* Inflammation induced NFATc1-STAT3 Transcription Complex Promotes Pancreatic Cancer initiation by KrasG12D. *Cancer discovery* 2014.

Baumgart S, Glesel E, Singh G, *et al.* Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2012;142:388-98 e1-7.

Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes & development* 1997;11:824-34.

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, *et al.* An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics* 2008;40:499-507.

Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, *et al.* Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* 2004;103:2956-64.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 1997;3:730-7.

Bosetti C, Bertuccio P, Malvezzi M, *et al.* Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013.

- Brooks CL, Gu W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Molecular cell* 2006;21:307-15.
- Buchholz M, Ellenrieder V. An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2007;6:16-9.
- Buchholz M, Schatz A, Wagner M, *et al.* Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *The EMBO journal* 2006;25:3714-24.
- Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nature reviews Cancer* 2001;1:68-76.
- Castellanos JA, Merchant NB, Nagathihalli NS. Emerging targets in pancreatic cancer: epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells. *OncoTargets and therapy* 2013;6:1261-7.
- Chang CJ, Chao CH, Xia W, *et al.* p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nature cell biology* 2011;13:317-23.
- Chang CP, Neilson JR, Bayle JH, *et al.* A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* 2004;118:649-63.
- Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, *et al.* Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular cell* 2007;26:745-52.
- Chen NM, Singh G, Koenig A, *et al.* NFATc1 Links EGFR Signaling to Induction of Sox9 Transcription and Acinar-Ductal Transdifferentiation in the Pancreas. *Gastroenterology* 2015;148:1024-34 e9.
- Chene P. In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *Journal of molecular biology* 1998;281:205-9.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science (New York, NY)* 1994;265:346-55.
- Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008;456:344-9.
- Costa A, Marasca R, Valentinis B, *et al.* p53 gene point mutations in relation to p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancers. *The Journal of pathology* 1995;176:45-53.
- Cox JL, Wilder PJ, Desler M, Rizzino A. Elevating SOX2 levels deleteriously affects the growth of medulloblastoma and glioblastoma cells. *PloS one* 2012;7:e44087.
- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annual review of medicine* 2007;58:267-84.
- Damjanov I, Fan F. *Cancer Grading Manual*. New York: Springer; 2007.

Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA. Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy? *mAbs* 2009;1:12-25.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development* 2003;17:1253-70.

Douglas D, Hsu JH, Hung L, *et al.* BMI-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A repression. *Cancer research* 2008;68:6507-15.

el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics* 1992;1:45-9.

Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *Journal of molecular cell biology* 2011;3:44-50.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics* 2008;9:102-14.

Frazier MW, He X, Wang J, Gu Z, Cleveland JL, Zambetti GP. Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Molecular and cellular biology* 1998;18:3735-43.

Friday BB, Horsley V, Pavlath GK. Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *The Journal of cell biology* 2000;149:657-66.

Furman JL, Artiushin IA, Norris CM. Disparate effects of serum on basal and evoked NFAT activity in primary astrocyte cultures. *Neuroscience letters* 2010;469:365-9.

Garajová I, Le Large TY, Frampton AE, Rolfo C, Voortman J, Giovannetti E. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs in the chemoresistance of pancreatic cancer. *BioMed research international* 2014;2014:678401.

Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 2001;105:863-75.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* 2006;34:D140-4.

Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development (Cambridge, England)* 2002;129:2447-57.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005;24:2899-908.

He L, He X, Lim LP, *et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007;447:1130-4.

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, *et al.* Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell* 2007;1:313-23.

Herreros-Villanueva M, Bujanda L, Billadeau DD, Zhang JS. Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 2014;20:2247-54.

Herreros-Villanueva M, Zhang JS, Koenig A, *et al.* SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 2013;2:e61.

Hessmann E, Schneider G, Ellenrieder V, Siveke JT. MYC in pancreatic cancer: novel mechanistic insights and their translation into therapeutic strategies. *Oncogene* 2015.

Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, *et al.* Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 1990;1:571-80.

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell* 2003;4:437-50.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell* 2005;7:469-83.

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development* 2003;17:2205-32.

Hruban RH, Maitra A, Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International journal of clinical and experimental pathology* 2008;1:306-16.

Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterology clinics of North America* 2007;36:831-49, vi.

Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, *et al.* An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *The American journal of surgical pathology* 2004;28:977-87.

Hu QL, Jiang QY, Jin X, *et al.* Cationic microRNA-delivering nanovectors with bifunctional peptides for efficient treatment of PANC-1 xenograft model. *Biomaterials* 2013;34:2265-76.

International Agency for Research on Cancer. International Agency for Research on Cancer, November 2012. (Accessed 2013/11/11, at <http://p53.iarc.fr/TP53SomaticMutations.aspx>.)

Jackson EL, Willis N, Mercer K, *et al.* Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & development* 2001;15:3243-8.

Ji Q, Hao X, Zhang M, *et al.* MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PloS one* 2009;4:e6816.

Kato S, Han SY, Liu W, *et al.* Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:8424-9.

Koenig A, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V. Primers on molecular pathways--the NFAT transcription pathway in pancreatic cancer. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al] 2010a;10:416-22.

Koenig A, Linhart T, Schlengemann K, *et al.* NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 2010b;138:1189-99 e1-2.

Koorstra JB, Hong SM, Shi C, *et al.* Widespread activation of the DNA damage response in human pancreatic intraepithelial neoplasia. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2009;22:1439-45.

Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al] 2008;8:110-25.

Kuhnle M, Egger M, Muller C, *et al.* Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *Journal of medicinal chemistry* 2009;52:1190-7.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.

Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, *et al.* Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007;120:1046-54.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-54.

Lee Y, Han J, Yeom KH, Jin H, Kim VN. Drosha in primary microRNA processing. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2006;71:51-7.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* 2007;67:1030-7.

Li D, Su D, Xue L, Liu Y, Pang W. Establishment of pancreatic cancer stem cells by flow cytometry and their biological characteristics. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015;8:11218-23.

Li Y, VandenBoom TG, 2nd, Kong D, *et al.* Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer research* 2009;69:6704-12.

Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. *Chinese journal of cancer* 2013;32:483-7.

Liu C, Kelnar K, Liu B, *et al.* The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nature medicine* 2011;17:211-5.

Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807-15.

Lo HW, Hsu SC, Xia W, *et al.* Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer research* 2007;67:9066-76.

Loh C, Shaw KT, Carew J, *et al.* Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:10884-91.

Lu J, Getz G, Miska EA, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-8.

Lu Y, Zhu H, Shan H, *et al.* Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer letters* 2013;340:113-23.

Luo C, Shaw KT, Raghavan A, *et al.* Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:8907-12.

Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;24:792-800.

Mammucari C, Tommasi di Vignano A, Sharov AA, *et al.* Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Developmental cell* 2005;8:665-76.

Mancini M, Toker A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nature reviews Cancer* 2009;9:810-20.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.

McCaughan F, Pole JC, Bankier AT, *et al.* Progressive 3q amplification consistently targets SOX2 in preinvasive squamous lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;182:83-91.

Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:3130-40.

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one* 2008;3:e2888.

Murray OT, Wong CC, Vrankova K, Rigas B. Phospho-sulindac inhibits pancreatic cancer growth: NFATc1 as a drug resistance candidate. *International journal of oncology* 2014;44:521-9.

Nalls D, Tang SN, Rodova M, Srivastava RK, Shankar S. Targeting epigenetic regulation of miR-34a for treatment of pancreatic cancer by inhibition of pancreatic cancer stem cells. *PloS one* 2011;6:e24099.

Neal JW, Clipstone NA. A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:17246-54.

Nikorowitsch J. Charakterisierung der Kooperation von NFATc1 und KrasG12D bei der Genese des Pankreaskarzinoms im transgenen Mausmodell [Dissertation]: Marburg; 2013.

Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, *et al.* Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 2004;119:847-60.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010;2:a001008.

Ottendorf NA, de Wilde RF, Maitra A, Hruban RH, Offerhaus GJ. Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology research international* 2011;2011:620601.

Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *The Journal of clinical investigation* 2004;113:175-9.

Partensky C. Toward a better understanding of pancreatic ductal adenocarcinoma: glimmers of hope? *Pancreas* 2013;42:729-39.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology* 2007;17:118-26.

Pinho AV, Rooman I, Real FX. p53-dependent regulation of growth, epithelial-mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2011;10:1312-21.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews Cancer* 2009;9:265-73.

Proctor E, Waghray M, Lee CJ, *et al.* Bmi1 enhances tumorigenicity and cancer stem cell function in pancreatic adenocarcinoma. *PloS one* 2013;8:e55820.

Quint K, Tonigold M, Di Fazio P, *et al.* Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition. *International journal of oncology* 2012;41:2093-102.

Rachagani S, Macha MA, Heimann N, *et al.* Clinical implications of miRNAs in the pathogenesis, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *Advanced drug delivery reviews* 2015;81:16-33.

Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annual review of immunology 1997;15:707-47.

Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, *et al.* Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. Journal of the National Cancer Institute 2010;102:340-51.

Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. Molecular and cellular biology 2008;28:7168-81.

Rocheffort MM, Ankeny JS, Kadera BE, *et al.* Impact of Tumor Grade on Pancreatic Cancer Prognosis: Validation of a Novel TNMG Staging System. Annals of surgical oncology 2013.

Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H. The p53/miR-34 axis in development and disease. Journal of molecular cell biology 2014;6:214-30.

Sanada Y, Yoshida K, Ohara M, Oeda M, Konishi K, Tsutani Y. Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intraductal components. Pancreas 2006;32:164-70.

Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, *et al.* Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. Cancer research 2009;69:2887-95.

Satoh K, Hamada S, Shimosegawa T. Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. Journal of gastroenterology 2015;50:140-6.

Sattler HP, Lensch R, Rohde V, *et al.* Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. The Prostate 2000;45:207-15.

Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. Molecular cancer 2003;2:15.

Seitz H, Zamore PD. Rethinking the microprocessor. Cell 2006;125:827-9.

Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2012;23 Suppl 7:vii33-40.

Shankar S, Nall D, Tang SN, *et al.* Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition. PloS one 2011;6:e16530.

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. Science (New York, NY) 1988;241:202-5.

Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH. STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 2009;27:2383-92.

Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010;29:4741-51.

Singh SK, Chen NM, Hessmann E, *et al.* Antithetical NFATc1-Sox2 and p53-miR200 signaling networks govern pancreatic cancer cell plasticity. *The EMBO journal* 2015;34:517-30.

Spalding D, Williamson RCN. Pancreatic cancer. *Medicine* 2007;35:325-9.

Spike BT, Wahl GM. p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes & cancer* 2011;2:404-19.

Srivastava SK, Arora S, Singh S, Bhardwaj A, Averett C, Singh AP. MicroRNAs in pancreatic malignancy: progress and promises. *Cancer letters* 2014;347:167-74.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.

Tanase CP, Neagu AI, Necula LG, *et al.* Cancer stem cells: involvement in pancreatic cancer pathogenesis and perspectives on cancer therapeutics. *World journal of gastroenterology : WJG* 2014;20:10790-801.

Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:15472-7.

Todesursachenstatistik. GBE-Bund, 2013. 2015/12/10, at http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=XWD_6&OPINDEX=5&HANDLER=XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=XWD_34&D.000=3735&D.001=1000001&D.002=1000002&D.003=1000004&D.022=9992&D.007=9213.

Tsutsumi-Ishii Y, Tadokoro K, Hanaoka F, Tsuchida N. Response of heat shock element within the human HSP70 promoter to mutated p53 genes. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 1995;6:1-8.

Tu C, Tan YH, Shaw G, *et al.* Impact of low-frequency hotspot mutation R282Q on the structure of p53 DNA-binding domain as revealed by crystallography at 1.54 angstroms resolution. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2008;64:471-7.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011;378:607-20.

Völker N. Die Rolle von NFATc1 und p53 bei der epithelial-mesenchymalen Transition des Pankreaskarzinoms [Dissertation]: Marburg; voraussichtlich 2016.

Wade M, Wang YV, Wahl GM. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. Trends in cell biology 2010;20:299-309.

Wang X, Liu Q, Hou B, *et al.* Concomitant targeting of multiple key transcription factors effectively disrupts cancer stem cells enriched in side population of human pancreatic cancer cells. PloS one 2013;8:e73942.

Wang Z, Li Y, Kong D, *et al.* Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. Cancer research 2009;69:2400-7.

Wasif N, Ko CY, Farrell J, *et al.* Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging? Annals of surgical oncology 2010;17:2312-20.

Wellner U, Schubert J, Burk UC, *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. Nature cell biology 2009;11:1487-95.

Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, *et al.* Recent progress in pancreatic cancer. CA: a cancer journal for clinicians 2013;63:318-48.

Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, Segal E, Chang HY. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. Cell stem cell 2008;2:333-44.

Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. Nature reviews Gastroenterology & hepatology 2009;6:412-22.

Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, *et al.* MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. Molecular cancer 2010;9:169.

Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. Nature reviews Drug discovery 2009;8:806-23.

Zhou J, Wang CY, Liu T, *et al.* Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. World journal of gastroenterology : WJG 2008;14:925-30.

Zhou W, Lv R, Qi W, *et al.* Snail contributes to the maintenance of stem cell-like phenotype cells in human pancreatic cancer. PloS one 2014;9:e87409.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Karzinogenese des Pankreaskarzinoms vom normalen Epithel bis zu PanIN-3-Läsionen.....	- 4 -
Abb. 2: Anteil der Mutationsformen aller <i>TP53</i> -Mutationen in 285 Pankreaskarzinomgeweben.....	- 7 -
Abb. 3: Prozentuale Häufigkeit der <i>TP53</i> -Mutationen in 281 Pankreaskarzinomgeweben in Abhängigkeit von der Codon-Position.....	- 7 -
Abb. 4: Primärstruktur von NFAT.....	- 11 -
Abb. 5: Der Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-Signalweg.....	- 13 -
Abb. 6: Schematische Darstellung des Genkonstrukts für c.n.NFATc1.....	- 15 -
Abb. 7: Differenzierungsgrade muriner Pankreaskarzinome von transgenen Mäusen mit dem Genotyp NKC.....	- 16 -
Abb. 8: Differenzierungsgrade muriner Pankreaskarzinome von transgenen Mäusen mit dem Genotyp NKC.....	- 16 -
Abb. 9: Expression von Sox2 in PanIN-Läsionen und unterschiedlich differenzierten humanen Pankreaskarzinomen.....	- 19 -
Abb. 10: Kreuzungsschema zum Erhalt der transgenen Maus mit Genotyp $\text{KNP}^{+/-}\text{C}$	- 41 -
Abb. 11: Aktivierung der genetischen Veränderung <i>Kras</i> ^{G12D} (A), c.n.NFATc1 (B) und <i>p53</i> ^{Δ2-10} (C) durch die pankreasspezifische p48-gekoppelte Cre-Rekombinase.....	- 42 -
Abb. 12: Strukturformeln von (A) Desoxythymidin und (B) Bromdesoxyuridin.....	- 50 -
Abb. 13: Charakterisierung der $\text{KNP}^{+/-}\text{C}$ -Maus.....	- 67 -
Abb. 14: Immunhistochemische Analyse der Expression von HA-NFATc1, p53 und CK-19 in $\text{KNP}^{+/-}\text{C}$ -Tumoren.....	- 68 -
Abb. 15: Histologie und Grading von $\text{KNP}^{+/-}\text{C}$ -Tumoren.....	- 69 -
Abb. 16: Expressionsverhalten von p53, Sox2, Klf4 und Oct4 in murinem Pankreaskarzinomgewebe.....	- 70 -
Abb. 17: Expressionsverhalten von Sox2 und Klf4 in murinem Pankreaskarzinomgewebe unterschiedlichen Genotyps.....	- 71 -
Abb. 18: GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS auf Basis eines DNA-Microarrays.....	- 72 -

Abb. 19: Heatmap, die die Auswirkung der genetischen Depletion von p53 auf die Expression bestimmter Stammzellregulatoren in NKC II Zellen demonstriert.....	- 72 -
Abb. 20: Einfluss der genetischen Depletion von p53 auf die mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Oct4 und Bmi1 in NKC II Zellen.	- 73 -
Abb. 21: Einfluss der genetischen Depletion von p53 auf die Proteinexpression von Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 in NKC II Zellen.....	- 74 -
Abb. 22: Einfluss der genetischen Depletion von p53 auf die Sphere-Formation sowie auf die mRNA-Expression von p53 und Sox2 in NKC II Zellen.	- 75 -
Abb. 23: Expressionsverhalten von microRNA 200c und microRNA 34a in Pankreaskarzinomgewebe mit unterschiedlicher p53 Aktivität.	- 76 -
Abb. 24: Expressionsverhalten von microRNA 200c und microRNA 34a in den Pankreaskarzinomzelllinien NKC II, KNPC 001 und KNPC del3.	- 77 -
Abb. 25: Auswirkung der genetischen Depletion von p53 auf die Expression von microRNA 34a und 200c in NKC II Zellen.....	- 78 -
Abb. 26: Einfluss der Überexpression von microRNA 34a und 200c auf die Expression von Sox2, Klf4 und Bmi1 in KNPC 001 Zellen.	- 79 -
Abb. 27: Einfluss der Überexpression von microRNA 200c auf die Expression von Sox2 und Klf4 in KNPC 001 und KNPC del3 Zellen.	- 80 -
Abb. 28: Einfluss der Inhibition von microRNA 34a und microRNA 200c auf die Proteinexpression von Sox2 und Klf4 in NKC II Zellen.....	- 81 -
Abb. 29: Einfluss der Überexpression von microRNA 200c auf die Sphere-Formation und die Expression von Sox2 in KNPC 001 Zellen.....	- 82 -
Abb. 30: Expressionsverhalten von Sox2, Klf4 und Nanog in Pankreaskarzinomgewebe unterschiedlichen Genotyps.....	- 83 -
Abb. 31: Expressionsverhalten von Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1 in Pankreaskarzinomgewebe.....	- 84 -
Abb. 32: Einfluss der genetischen Depletion von NFATc1 auf die mRNA-Expression von Sox2 und Bmi1 in KNPC 001 Zellen.....	- 85 -
Abb. 33: Auswirkung der genetischen Depletion von NFATc1 auf die Proteinexpression von Sox2, Klf4, Oct4, und Bmi1 in KNPC 001 Zellen.....	- 86 -
Abb. 34: Einfluss von Cyclosporin A auf die mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Nanog und Bmi1 in KNPC 001 Zellen.....	- 87 -

Abb. 35: Einfluss der genetischen Depletion von NFATc1 auf die mRNA-Expression von NFATc1 und Sox2 in Panc-1 Zellen.....	- 88 -
Abb. 36: Einfluss von Cyclosporin A auf die mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Oct4, Nanog in Panc-1 Zellen.....	- 89 -
Abb. 37: Einfluss von CsA auf Expression von NFATc1, Sox2 und Klf4 in L3.6 Zellen....	- 90 -
Abb. 38: Direkte Bindung von NFATc1 an Enhancer von Sox2 in KNPC 001 Zellen.....	- 91 -
Abb. 39: Direkte Bindung von NFATc1 an Promotor und Enhancer von SOX2 und Rekrutierung von RNA-Polymerase II in L3.6 Zellen.....	- 92 -
Abb. 40: Expressionsverhalten von NFATc1, SOX2, Klf4, Nanog und Bmi1 in epithelialen Zellen verglichen mit dem in Spheres.....	- 94 -
Abb. 41: Auswirkung der genetischen Depletion von NFATc1 auf die Sphere-Formation und die mRNA-Expression von Sox2, Klf4 und Oct4 in KNPC 001 Zellen.	- 95 -
Abb. 42: Einfluss von Cyclosporin A auf die Sphere-Formation und die mRNA-Expression von Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und in KNPC 001 Zellen.	- 96 -
Abb. 43: Einfluss von Cyclosporin A auf die Sphere-Formation und die mRNA-Expression von NFATc1, Sox2, Klf4, Oct4 und Nanog in KNPC del3 Zellen.....	- 97 -
Abb. 44: Der Einfluss der genetischen Depletion von NFATc1 auf die Sphere-Formation und die Proteinexpression von NFATc1 und Sox2.....	- 98 -
Abb. 45: Der Einfluss der genetischen Depletion von Sox2 auf die Sphere-Formation in KNPC 001 Zellen.....	- 99 -
Abb. 46: Auswirkung von CsA und Gemcitabine auf die Proliferation von KNPC 001 Zellen.....	- 101 -
Abb. 47: Auswirkung von CsA und Gemcitabine auf Proliferation von L3.6 Zellen.....	- 101 -
Abb. 48: Auswirkung von CsA und Gemcitabine auf die Proliferation von PDAC 10/11/11 Zellen	- 102 -
Abb. 49: Anteil nukleärer Expression von p53 in humanen Pankreaskarzinomen.	- 103 -
Abb. 50: Immunhistochemische Analyse der Expression von p53 und HA-NFATc1 in unterschiedlich differenzierten NKC-Pankreastumoren.	- 104 -
Abb. 51: Prozentuale Verteilung der Differenzierungsgrade von KNPC-Tumoren.....	- 105 -
Abb. 52: Kaplan-Meyer-Kurven zum Vergleich der Überlebensdauer der Mauslinien NKC, KNPC, KNP ^{+/-} C und p48-Cre.....	- 106 -

Abb. 53: Regulation der Expression von Sox2, Klf4 und Bmi1 durch die p53-getriggerte Inhibition mittels miRNA-200c bei intaktem p53.....	- 108 -
Abb. 54: Prozentualer Anteil NFATc1-positiver Tumore in KPC (<i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>p53</i> ^{R172H} ; <i>Pdx1-Cre</i>)-Tumoren unterschiedlicher Differenzierung	- 109 -
Abb. 55: NFATc1 steigert die Expression der Stammzellfaktoren Sox2, Klf4, Oct4, Nanog und Bmi1.....	- 110 -
Abb. 56: Regulation von Sox2 durch NFATc1 als Transkriptionsfaktor.....	- 112 -
Abb. 57: Entstehung und Funktion von stammzellähnlichen Tumorzellen im Pankreaskarzinom und die Bedeutung von Sox2.....	- 113 -
Abb. 58: Gegenläufige Regulation des Stammzellfaktors Sox2 durch den Transkriptionsfaktor NFATc1 und den Tumorsuppressor p53.....	- 118 -

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Grading des dukalen Adenokarzinoms des Pankreas	- 2 -
Tab. 2: Die häufigsten Mutationen im humanen Pankreaskarzinom	- 4 -
Tab. 3: Liste der verwendeten PCR-Programme zur Genotypisierung.....	- 52 -
Tab. 4: Länge der Amplifikate.....	- 53 -
Tab. 5: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels	- 55 -

8.3 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ABC-Pumpe	<i>ATP-Binding-Cassette-Pumpe</i>
AG	Arbeitsgruppe
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
bEGF	<i>Basic Epidermal Growth Factor</i>
Bmi1	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CK-1	Casein-Kinase-1
CK-19	Cytokeratin 19
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CRAC	<i>Ca²⁺ release activated channels</i>
CsA	Cyclosporin A
CSC	<i>Cancer Stem Cell</i>
C _T	<i>Cycle Threshold</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAB	Diaminobenzidin
DIM	3,3'Diinodolylmethan

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DYRK	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGTA	Ethylenglykolaminoethylester
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ESA	<i>Epithelial-specific Antigen</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FDR	<i>False discovery rate</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
Gly	Glycin
GSEA	<i>Gen Set Enrichment Analysis</i>
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hämagglutinin
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure

HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
InsP3	Inositol-1,2,4-triphosphat
IP	Immunpräzipitation
iPS-cells	<i>induced pluripotent stem cells</i>
IPMN	<i>intraductal papillary mucinous neoplasm</i>
Klf4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
KNPC	<i>Kras^{G12D};c.n.NFATc1;p53^{R172H};p48-Cre</i>
KNP ^{+/-} C	<i>Kras^{G12D};c.n.NFATc1;p53^{flox};p48-Cre</i>
KNPC del3	<i>Kras^{G12D};c.n.NFATc1;p53^{flox};p48-Cre Zelllinie °3</i>
KPC	<i>Kras^{G12D};Trp53^{R172H};Pdx1-Cre</i>
LSL	Lox-Stop-Lox
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAP2K	MAPK-Kinase
MAPK	MAP-Kinase
MCN	<i>mucinous cystic neoplasm</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
miR	microRNA
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	<i>Non essential Amino acids</i>
NES	<i>Normalized Enrichment Score</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NHR	NFAT homologe Region
NKC	<i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};p48-Cre</i>

NLS	nukleare Lokalisationssequenz
NP-40	Nonidet P40
Oct4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
PanIN	<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PBND	<i>PCR Buffer with Nonionic Detergents</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDAC	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pdx1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
Pen/Strept	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PLC γ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
Ptf1	<i>Pancreas transcription factor 1</i>
qPCR	quantitative <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RE	<i>Responsive Element</i>
RHR	Rel homologe Region
RIPA-Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation Assay-Puffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative PCR
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
Sox2	<i>sex determining region Y (SRY) box 2</i>
SP	Serin-Prolin-reiche Region
SRR	Serin-reiche Region
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered Saline with Tween</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UV	Ultraviolett
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>
ZEB2	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 2</i>

8.4 Schreibweisen

<i>Kursiv klein (z.B. Trp53)</i>	murines Gen/DNA
<i>KURSIV GROSS (z.B. TP53)</i>	humanes Gen/DNA
Normal klein (z.B. p53, Sox2)	mRNA- oder Proteinexpression (murin/human)

8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Ahrens, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bien, Bösner, Bohlander, Brehm, Buchholz, Burchert, Cetin, Czubayko, Daniel, Daut, Decher, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Engenhardt-Cabilic, Fendrich, Feuser, Frohme, Fuchs-Winkelmann, Geks, Geldner, Görg C., Gress, Grimm, Grosse, Grundmann, Haberhausen, Hadji, Hegele, Hertl, Hildebrandt, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jacob, Jerrentrup, Kalder, Kann, Kill, Kim-Berger, Kircher, Kirschbaum, Klenk, Klose, Kluge, Köhler, Kolb-Niemann, Koolman, Krieg, Kruse, Kühne, Kühnert, Kwee, Leonhardt, Leube, Lill, Löffler, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maisch, Meissner, Metzelder, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Nimsky, Oberwinkler, Oertel, Olbert, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pantazis, Parahuleva, Plant, Ramaswamy, Rausch, Renz, Rey del, Richter, Röhm, Röper, Röttgers, Roeßler, Rolfes, Rosenow, Rost, Rothmund, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schmidt, Schoner, Schoppet, Schratt, Schu, Schwarz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stahl, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Stiewe, Stiller, Suske, Tackenberg, Teymoortasch, Thieme, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Weiß, Werner, Westermann, Wilhelm, Wrocklage, Wulf, Wündisch, Yu, Zoremba, Zemlin, Zettl, Zovko

8.6 Danksagung

Mein herzlicher und aufrichtiger Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Volker Ellenrieder, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben und mir somit eine spannende Zeit im Labor ermöglicht hat. Durch seine mitreißende Art hat er es geschafft, mich immer wieder aufs Neue zu motivieren. An dieser Stelle auch ein Dank an seine Frau Claudia, durch die der Kontakt erst entstanden ist.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gress, dass ich meine Arbeit in der Abteilung für Gastroenterologie anfertigen durfte.

Shiv Singh danke ich herzlich für die Betreuung meines Projektes. Ich wünsche ihm und seiner kleinen Familie alles Gute für die Zukunft. Ein besonderer Dank gilt Elisabeth Hessmann für ihre gutmütige Art und ihre Hilfe und fachliche Unterstützung. Herzlichen Dank an Bettina Geisel und Kristina Reutlinger für die geduldige Einführung in die Laborarbeit. Vielen Dank auch an Garima, Naiming, Sandra, Martin, Fabian, Terry und Thore für die gute und häufig lustige Zusammenarbeit im Labor.

Ganz besonderer Dank geht an meine sehr gute Freundin, Kommilitonin und Mitdotorandin Nadine Völker. Vielen Dank für die super Zusammenarbeit und die vielen unvergessenen Stunden im Mausstall, an Mikrotom und Mikroskop und außerhalb des Labors.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, vor allem meiner Schwester Julia, meinem Vater, meiner Mutter und Harald für die bedingungslose Unterstützung und das Verständnis während der gesamten Studienzeit. Vielen Dank an meine Mutter und meine Schwester Julia für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke an meinen Vater dafür, dass ich mich immer auf ihn verlassen kann.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Freund Magnus für die Hilfe und Unterstützung bei jedem einzelnen Schritt dieser Arbeit, seine endlose Geduld und für sechseinhalb wunderschöne Jahre.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Marburger Freunden danken: Vielen Dank an Jelena, Linda, Mareike, Lola, Norah, Hannes, Daniel, Eva, Franz, Claudi, Katha, Julius, Nesli und Pauline für die Freundschaft und für die tolle Zeit in Marburg.